

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-501830

(43)公表日 平成9年(1997)2月25日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
C 0 7 H 21/04		8615-4C	C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 15/09	Z N A	0274-2 J	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 27/62		0276-2 J	33/58	A
33/58		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
			審査請求 未請求	予備審査請求 有

(全 62 頁)

(21)出願番号	特願平7-505687	(71)出願人	アイシス・イノベーション・リミテッド
(86) (22)出願日	平成6年(1994)8月1日		イギリス国オックスフォード オーエック
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)1月30日		ス1・3ユービー, サウス・パークス・ロ
(86)国際出願番号	PCT/GB94/01675		ード 2
(87)国際公開番号	WO95/04160	(72)発明者	サザーン, エドウィン
(87)国際公開日	平成7年(1995)2月9日		イギリス国オックスフォード オーエック
(31)優先権主張番号	9315847, 5		ス2・6エックスジェイ, スタヴァート
(32)優先日	1993年7月30日		ン・ロード 30
(33)優先権主張国	イギリス (GB)	(72)発明者	カミンズ, ウィリアム・ジョナサン
			イギリス国ハートフォードシャー エイチ
			ビー23・4ジェイイー, トリング, ソーン
			ツリー・ドライブ 5
		(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

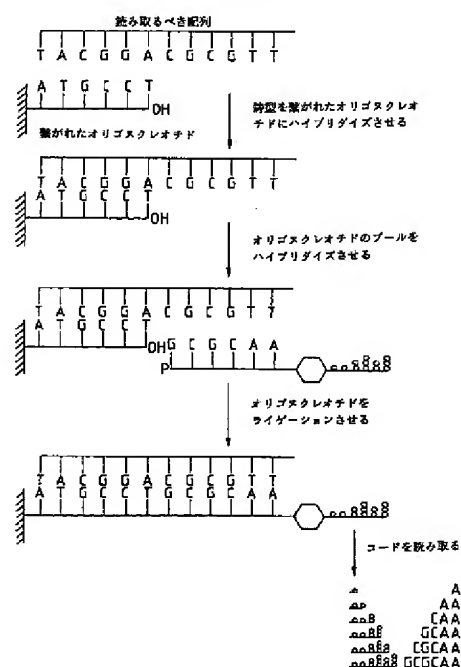
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タグ試薬およびアッセイ法

(57) 【要約】

試薬は：a) 少なくとも二つの被検残基を含み、およびb) に連結された被検部分；b) 質量分析法による検出に適応した一つまたはそれ以上のレポーター基を含むタグ部分を含んでおり、ここでレポーター基は被検残基を示し、およびタグ部分の各々の位置のレポーター基は被検部分の決められた位置の被検残基を示すように選ばれる。各々異なった被検部分を含む多数のそのような試薬は、標的物質を含むアッセイ法に使用されるであろう。タグ部分の分析は標的物質に結合された被検部分の性質を示している。核酸配列決定法は標的核酸の配列を決定するために本試薬のライブラリーを使用している。

Fig.5.



【特許請求の範囲】

1. a) 少なくとも二つの被検残基を含み、かつb) に連結された被検部分、
b) 質量分析法による検出に適応した一つまたはそれ以上のレポーター基を含むタグ部分
を含む試薬であって、
ここでレポーター基は被検残基を示し、およびタグ部分の各々の位置のレポーター基は被検部分の決められた位置の被検残基を示すように選ばれることを特徴とする試薬。
2. 被検部分およびタグ部分が結合される連結基が提供される請求項第1項に記載の試薬。
3. 被検部分がn個の被検残基の鎖であり、およびタグ部分がn個までのレポーター基の鎖であり、タグ鎖の各々の位置のレポーター基が被検鎖の対応する位置の被検残基を示すように選ばれる、請求項1または2項に記載の試薬。
4. 被検部分が光切断可能結合によりタグ部分に連結されている請求項1から3のいずれかに記載の試薬。
5. 式A-L-R(式中Aは被検部分を構成するn個の被検残基の鎖であり、Lは連結基であり、Rはタグ部分を構成するn個までのレポーター基の鎖であり、およびnは2-20である)を有し、ここでタグ部分は被検部分における被検残基の位置を決定する情報を含む、請求項1から4のいずれかに記載の試薬。
6. 連結基が被検部分合成のためのヒドロキシ、アミノまたはスルフヒドリル基およびタグ部分合成のための反応性基を有する芳香族基を含む、請求項2から5のいずれかに記載の試薬。
7. 被検部分合成のためのヒドロキシ、アミノまたはスルフヒドリル基を有する芳香族基がまた、光切断のためのo-ニトロ基も有する、請求項第6項に記載の試薬。
8. 質量分析法による分析のために荷電基が存在する、請求項1から7のいずれかに記載の試薬。
9. 被検部分がペプチド鎖である請求項1から8のいずれかに記載の試薬。

10. 被検部分がオリゴヌクレオチド鎖である請求項1から8のいずれかに記載の試薬。

11. 請求項1から10のいずれかに記載の試薬のライブラリーであって、各々が異なる被検部分を含む多数の試薬から構成されることを特徴とするライブラリー。

12. ライブラリーが n 個のヌクレオチドの異なったオリゴヌクレオチド鎖である異なった被検部分を各々が含む 4^n の試薬から構成される、請求項第11項に記載のライブラリー。

13. 試薬が溶液中と一緒に混合されている請求項第12項に記載のライブラリー。

14. 以下の工程：標的物質を用意し；標的物質と請求項11から13のいずれかに記載の試薬のライブラリーを、少なくとも一つの試薬が標的物質との結合を起こす条件下でインキュベートし；非結合試薬を除去し；各々の結合した試薬のタグ部分を回収し；そして標的物質に結合された被検部分の性質の指標として回収されたタグ部分を分析する、を含むアッセイ法。

15. 標的物質が生物体または組織または細胞群である請求項第14項に記載のアッセイ法。

16. 標的核酸の配列決定法であって、

a) 支持体上に固定化されたオリゴヌクレオチドを用意し、

b) 標的核酸と固定化オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、

c) b)からのハイブリッドと請求項第13項に記載のライブラリーをインキュベートして、ライブラリーの第一の試薬のオリゴヌクレオチド鎖を固定化オリゴヌクレオチドに隣接する標的核酸にハイブリダイズさせ、

d) 隣接するオリゴヌクレオチドをライゲーションし、このことによりライゲーションされた第一の試薬を形成し、

e) 他のライゲーションされなかった試薬を除去し；そして

f) 標的核酸の第一の部分の配列の指標として、ライゲーションされた第一の試薬のタグ部分を回収して分析する

の各工程を含む方法。

17. 下記の追加の工程：

c i) f) からのハイブリッドと請求項第13項に記載のライブラリーをインキュベートして、ライブラリーの第二の試薬のオリゴヌクレオチド鎖を第一の試薬のオリゴヌクレオチド鎖に隣接する標的核酸にハイブリダイズさせ、

d i) 隣接するオリゴヌクレオチドをライゲーションし、このことによりライゲーションされた第二の試薬を形成し、

e i) 他のライゲーションされなかった試薬を除去し；そして

f i) 標的核酸の第二の部分の配列の指標として、ライゲーションされた第二の試薬のタグ部分を回収して分析する、

を含む請求項第16項に記載の方法。

18. 工程a)においてオリゴヌクレオチドは支持体としての一連の針の末端に固定化されており；工程b)において標的DNAの個々のクローンを各々の個々の針に固定化されているオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ；工程c)およびd)において、異なるライゲーションされた試薬を有する異なる針を有する一連のライゲーションされた試薬が形成され；および工程f)において各々のライゲーションされた試薬のタグ部分が回収されおよび標的DNAの一部の配列の指標として分析される、請求項第16または17項に記載の方法。

19. 工程b)において標的DNAの各々の個々のクローンを支持体の個々の間隔をとった位置に固定化されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせ；工程c)およびd)において異なるライゲーションされた試薬を有する支持体の、異なる、間隔をとった位置を有する一連のライゲーションされた試薬が提供され；および工程f)において各々のライゲーションされた試薬のタグ部分が回収されおよび標的DNAの一部の配列の指標として分析される、請求項第16または17項に記載の方法。

20. 以下の工程：

a) 支持体上の間隔をとった位置に固定化されたオリゴヌクレオチドのアレイを用意し、一つの位置のオリゴヌクレオチドは他の位置のオリゴヌクレオチドとは異なっており、

b) 支持体上で一つまたはそれ以上の間隔をとった位置でハイブリッドを形成させるように標的核酸を固定化されたオリゴヌクレオチドのアレイとインキュベートし、

c) b) からのハイブリッドと請求項第13項に記載のライブラリーをインキュベートして、ライブラリーの試薬のオリゴヌクレオチド鎖を各々の固定化オリゴヌクレオチドに隣接する標的核酸にハイブリダイズさせ、

d) 隣接するオリゴヌクレオチドをライゲーションし、このことにより支持体上の一つまたはそれ以上の間隔をとった位置でライゲーションされた試薬を形成し、

e) 他のライゲーションされなかった試薬を除去し；そして

f) 標的核酸の一部の配列の指標として各々のライゲーションされた試薬のタグ部分を回収して分析する、

を含む請求項第16または17項に記載の方法；

21. 支持体上の各々間隔をとった位置に共有結合で固定化されているオリゴヌクレオチドの配列が知られている請求項第20項に記載の方法。

22. 標的DNAの分析法であって、

i) 支持体上に固定化された標的DNAを用意し、

ii) 異なる試薬のオリゴヌクレオチド鎖が支持体上の標的DNAにハイブリダイズするように、i) からの固定化された標的DNAを請求項第10項に記載の多数の試薬とともにインキュベートし、

iii) ハイブリダイズしていない試薬を除去し、そして

iv) 標的DNAの一部の配列の指標として各々の試薬のタグ部分を回収して分析する、

の各工程を含む方法。

23. 追加の工程：

ia) 異なる試薬のオリゴヌクレオチド鎖が標的DNAにハイブリダイズするように、iv) からのハイブリッドを請求項第13項に記載の試薬のライブラリーとともにインキュベートし、

iaa) 標的DNAにハイブリダイズした隣接するオリゴヌクレオチド

をライゲーションさせ、およびライゲーションされていない試薬を除去し、そして

i v a) 標的DNAの一部の配列の指標として各々のライゲーションされた試薬のタグ部分を回収して分析する、

を含む請求項第22項に記載の方法：

24. 標的核酸の個々のクローンが支持体上の間隔をとった位置に固定化され、このことにより工程i i)において異なる試薬のオリゴヌクレオチド鎖が支持体上の異なる、間隔をとった位置で標的核酸にハイブリダイズする、請求項第22または23項に記載の方法。

25. 各々のタグ部分がその付随する試薬から光切断により回収される、請求項第14から24のいずれかに記載の方法。

26. タグ部分が質量分析法により分析される、請求項第14から25のいずれかに記載の方法。

27. その上に二つまたはそれ以上の間隔をとった位置を持つ支持体；支持体上の間隔をとった位置に固定化された標的核酸の個々のクローン；および支持体上の間隔をとった位置で標的核酸の個々のクローンにハイブリダイズする請求項第10項の異なる試薬；を含むアッセイ器具。

【発明の詳細な説明】

タグ試薬およびアッセイ法

生化学的および化学的分析において、レポーター基で標識された被検体分子の使用は日常のことである。本発明は一つまたはそれ以上のレポーター基に連結された少なくとも二つの被検基を持つ試薬を提供する考えを提出している。以下に記載する方法においてそのような試薬は、一つのもので標識された被検体よりもはるかに多くの分析的情報を発生させるために使用できる。多被検基および多レポーター基を運ぶ試薬が一緒に合成でき、同時に使用できかつレポーター分子が分析段階で分解できるようにレポーター基を設計することは可能である。

WO 93/06121 (Affymax) は多数の異なるメンバーを含む合成オリゴマーライブラリーを記載しており、各々のメンバーはオリゴマー中のモノマーの配列を同定する一つまたはそれ以上の同定タグに連結されたモノマーの配列からなるオリゴマーを含んでいる。オリゴマーと同定タグ間の結合は好適には固形粒子を含む。同定タグは好適にはオリゴヌクレオチドである。

本発明の一つの態様では

- a) 少なくとも二つの被検基を含み、および
 - b) に連結された被検部分、
 - b) 質量分析法による検出に適応した一つまたはそれ以上のレポーター基を含むタグ部分
- を含む試薬が提供され、
- ここでレポーター基は被検残基を示し、かつタグ部分の各々の位置のレポーター基は被検部分の決められた位置の被検残基を示すように選択される。

好適には被検部分は切断可能な（例えば、光切断可能な）結合でタグ部分に連結されている。被検部分およびタグ部分が両方結合される連結基が提供されるであろう。好適には、被検部分は n 個の被検残基の鎖であり、およびタグ部分は n 個までのレポーター基の鎖であり、タグ鎖の各々の位置のレポーター基は被検鎖の対応する位置の被検残基を示すように選択される。 n は 2 以上の整数であり、好適には 3 から 20 である。

本発明は興味あるすべての被検体の検出に使用されるであろう。これらには蛋

白質／ペプチド鎖、したがって被検残基はアミノ酸残基；核酸／オリゴヌクレオチド鎖、したがって被検残基はヌクレオチド残基；炭化水素鎖、したがって被検残基は糖残基；が含まれるが、これらに制限されるわけではない。さらに、被検体は生物学的、薬学的または治療的活性を持つ小さな分子の類でもよい。例えば、質量分析タグと組合わさった様式で種々の置換基（例えば、アルキル、エステル、アミン、エーテルなど）を変化させる能力を持つコア分子であってもよい。

タグ部分および／またはその中の各々のレポーター基は被検部分および／またはその中の被検残基の性質についての情報を提供するように観察可能／検出可能／分析可能である。

一つの実施態様において、試薬は式 $A-L-R$ を持っており、式中 A は被検部分を構成する n 個の被検残基の鎖であり、および L は連結基であり、 R はタグ部分を構成する n 個までのレポーター基の鎖であり、 n は $2-20$ であり、ここでタグ部分は被検部分の被検残基の位置を規定する情報を含んでいる。

タグ部分は質量により区別可能な一つまたはそれ以上のレポーター基から成っており、従って質量分析法により分析可能である。レポーター基は化学的に異なっているとしてもよく、従ってお互いに分子量により区別される。または、レポーター基は化学的には同じであるがお互いに異なった同位元素（例えば、以下に説明されるように $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ および $^1\text{H}/^2\text{H}$ ）を含むことにより区別されてもよい。タグ部分（および／またはレポーター基）は、例えば光化学的にまたは他の手段で試薬から切断された後、質量分析法による分析に適しまたは適応している。

検出系としての質量分析法の利点は：その高い感度－良好な信号を与えるのに数百の分子しか必要とされない；その広いダイナミックレンジおよび高い分解能－ 100 から $200,000$ ダルトンの質量範囲の分子が 0.01 より小さい分解能で分析できる；その融通性－多くの異なった化学構造の分子が容易に分析される；質量分析法と例えば走査レーザー脱離法を組み合わせることによる画像分析の可能性；単に定性的測定ではなく定量的測定ができる能力である。

質量標識は放射能および蛍光の利点をあわせたものであり、新規の応用を示唆するさらなる特質を持っている。

別の態様において、本発明は上記試薬のライブラリーを提供し、ここでライブ

ライリーは各々 n 個の被検残基の異なった被検部分を含む多数の試薬から構成されている。例えば、ライブラリーは各々 n 個のヌクレオチド残基の異なったオリゴヌクレオチド鎖を含む 4^n の試薬から成っているであろう。ライブラリーの試薬は溶液中と一緒に混合されて存在するであろう。

別の態様において、本発明は：標的物質を用意し；少なくとも一つの試薬の標的物質への結合が生じる条件下で標的物質と前記試薬のライブラリーをインキュベートし；非結合試薬を除去し；各々の結合試薬のタグ部分を回収し；標的物質へ結合された被検部分の性質の指標として回収されたタグ部分を分析する、の各工程を含むアッセイ法を提供する。

標的物質は、非結合試薬から結合試薬を分離するのに都合のよい手段を提供するために固定化されているであろう。一つの態様では、標的物質は微生物または組織または細胞の集団であり、本アッセイは候補薬剤の一群をスクリーニングするために実施されるであろう。別の態様において標的物質は核酸であり、この態様は以下に非常に詳細に説明される。

付随する図を参照されたい：

- －図1は本発明による試薬合成のための一般的スキームである。
- －図2はレポーター基を含んでいるタグ鎖の3つの異なったシステムを持つ試薬を示している。
- －図3aはコードされたオリゴヌクレオチドの合成を示している図であり、および
- －図3bはタグ鎖のコードの読みとりを示している図である。
- －図4は累進的ライゲーションによる配列分析を示している図である。
- －図5はオリゴヌクレオチドアッセイでのハイブリッド形成により読みとられた配列の伸長を示す図である。

図1および2の説明は本明細書の最後に含まれている。

以下の応用の実施例を参照すると、本方法が如何に核酸配列の分析および候補薬剤のスクリーニングに応用されるかが説明されている。

コードされたタグの合成

同時に多被検体にタグを付けるために使用された方法の原理は、結合された核

酸配列でペプチドをコードするためにBrennerおよびLerner(1992)により提案されたものと同様である。彼らの考えの概念は、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されおよび産生されたDNA分子の配列決定により読みとることができるタグを付加することである。

試薬の構造は如何にしてそれらを作製しうるかを考えることにより最もよく示される。一つの方向に被検体へ残基を付加し、別の方向に残基特異性レポーター基を付加して段階的に伸長できる二価または多価連結基から合成が始まる(図1)。もし有機化合物の混合物を作りたいならば、合成の各々の段階で異なった残基が導入される。例えば、混合物は異なったアミノ酸配列を持つペプチドまたは異なった塩基配列を持つオリゴヌクレオチド、またはコア構造に結合された異なった基を持つ医薬活性を持つ可能性のある変異体の組を含むことができる；各々の場合において各々の構造変異体を独特のタグで標識することが望まれる。このことは異なった残基が問題とする化合物に加えられる各々の工程において合成物を分割し、対応する残基をタグに加えることにより達成される。

例として、各々が独特のタグを持つ4096のヘキサヌクレオチドの混合物を作りたいと仮定する。二価連結基の四つの試料が各々の塩基および塩基に対して独特のレポーターと結合されるであろう(図3a)。四つの試料は次に混合され、四つに分割され、この過程を再度繰り返す。結果は各々独特のタグを持つジヌクレオチドの組である。この過程を6回の結合工程が完了するまで繰り返す。

連結基およびレポーター基

連結基は被検体合成と合致する一つの基を持たなければならない—ヒドロキシ、アミノまたはスルフヒドリル基はすべてオリゴヌクレオチド合成の開始に適しており、例えばポリペプチド合成などの他の経路の開始には類似の基を見いだすことができる。ある種の化合物に対しては、被検体の一部を形成する”コア”化合物から出発するのが望ましいであろう。レポーターの付加を開始するための基の選択はレポーター基の性質およびそれらの結合に使用される化学に依存している。この化学は被検体の合成に使用される化学と合致されていなければならない。オリゴヌクレオチド合成の例では、多くの変法が存在する。確立された方法は塩基を保護するためにベンゾイルおよびイソプロピル基、カップリング間の5'

— O

H基の一時的保護に酸に反応活性なトリチル基、およびリン酸を保護するのにβ-シアノエチル基を使用している。レポーターのカップリングのために使用される方法はこれらの保護基またはオリゴヌクレオチドのその他の結合を攻撃してはならず、タグの合成はオリゴヌクレオチドの伸長に使用されるカップリング、酸化および脱保護により影響されるべきではない。

被検体はレポーター構造の組合わさった組へ結合されるので、レポーターモノマーのカップリングまたは鎖のキャッピングは各々の工程で不完全であろう（図2、BおよびC）。このことはタグの組成からの被検体の構造の演繹をより簡単にするであろう（図1；図3）。合成をより容易にするため、連結基は被検体またはレポーター基の分解を起こさずに切断できる結合により固形支持体へ結合されているのが望ましい。もしくは、連結基は試薬からの中間体および最終生成物の分離を可能にするような荷電基または親油性基のような基を持っているであろう。

レポーター基は多くの形をとることができるが、質量分析法によりタグの組成または配列が読み取れるという要求を主として考慮する。可能性としては、異なった長さまたは異なった同位元素組成の脂肪族鎖のような異なった原子または式量の基が挙げられる。同位元素で標識したメチレン基を用いて、独特の式量の基を四つの異なったレポーターの各々に帰属させることが可能である（表1）。

表1

水素および炭素の同位元素に基づいたレポーターの例：

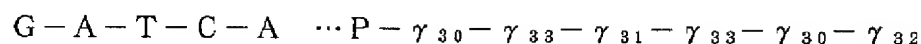
同位体組成	式量 ($-OCH_2$)	記号	塩基
$^{12}CH_2$	30	γ_{30}	A
^{12}CHD 、 $^{13}CH_2$	31	γ_{31}	C
$^{12}CD_2$ 、 ^{13}CHD	32	γ_{32}	G
$^{13}CD_2$	33	γ_{33}	T

オリゴヌクレオチドを例にすると、これらのタグはそのシリーズの部分生成物

の質量の増加からオリゴヌクレオチド中の各々の位置の塩基を読み取ることができる（表2）。レポーターを加えることによる最も少ない増加分が最も小さいレポーターと最も大きいレポーターの間の質量相違より大きいならば、すべてのオリゴヌクレオチド配列は一連の独特のタグ断片質量を与えるであろう。

表2

同位体レポーターを持つオリゴヌクレオチドの例：



部分生成物の式量 $F_p + 30, +63, +94, +127, +157, +190$

P = 光反応活性連結基 $F_p = P$ の式量

質量分析のためには、被検体からタグ鎖を切断する簡単な方法があることが望まれるであろう。いくつかの可能性が存在する。オリゴヌクレオチドおよびペプチド被検体に合致する方法には：光反応活性連結の光誘導切断；酵素切断、例えばエステル連結；フリーラジカル誘導切断がある。

さらに要求されることは、タグは分析に使用される化学的および生化学的過程に合致可能でなければならないことであり：分子ハイブリッド形成に使用されるオリゴヌクレオチドの例または提案された配列決定法の一つについては、それらは溶解可能でなければならない、および分析で使用されるであろうある種の酵素反応を阻害してはならない。表1に示されたメチレン類似体と同様なオリゴエチレングリコール結合がオリゴヌクレオチドの分子再会合に合致することが経験から示された。さらに、そのような結合は、ヘキサエチレングリコール連結基を通してガラスにつながれたオリゴヌクレオチドがポリヌクレオチドキナーゼおよびATP処理により5'-ホスホモノエステルへ変換できることを示したように、少なくともいくつかの酵素反応と合致している。

連結基の望まれる性質

考えられる応用のために、連結基分子は以下の性質を持っていることが望まれる：

中間体の煩わしい精製を必要とせずに、被検体および対応するタグを産生する合成サイクルを進行させることを可能にするため、連結基は固形支持体に連結可能でなければならない。合成サイクルに続いて、連結基は被検体およびタグが無傷のまま残される条件下で固形支持体から除去可能でなければならない。タグ合成のための官能基は、質量分析によりお互いに区別可能であるタグの容易な合成を可能にするようなものでなければならない。

連結基は、被検体およびタグの別々の伸長を、その一つのための化学が他方の化学を妨害しない条件下で可能にするような保護された官能基を持っていないなければならない。

連結基は好適には質量分析をマトリックス非存在下で実施できるように荷電された基を持っていないなければならない。さらにこの目的のために、タグは電気噴霧のような複雑な技術によらずに質量分析器内で十分に蒸発するように揮発性である化合物を含むことが望まれる。タグは安定なイオンかまたは対応する被検体の同定に使用できる特徴的なパターンに断片化するイオンを生じるべきである。

タグをレーザー照射により質量分析器内で直接切断できるように、タグと被検体の間の結合は好適には光で切断可能でなければならず、ライゲーションなどのような生化学的工程を可能にするように完全に除去するための更なる切断はランブに暴露することにより都合良く実施できる。

連結された生成物は好適には、生化学的反応に使用できるように水性溶媒に可溶でなければならない。

ここに記載された実施例はこれらの望まれる性質を持つ連結基を示している。

光切断可能基

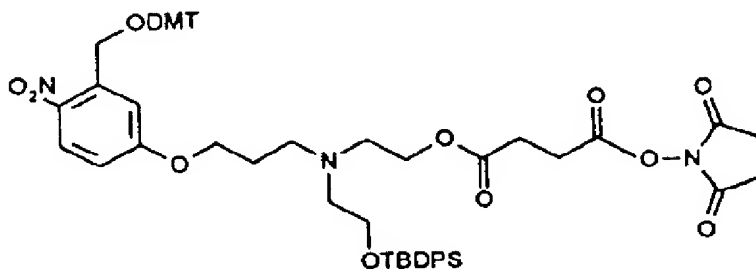
光切断可能基は既知の光反応活性 *o*-ニトロベンジル基に基づいてきた。この基はオリゴヌクレオチド合成においてリン酸基および2' ヒドロキシ基の両方の

保護基として使用されてきた [Pillai Synthesis 1 (1980) の総説を参照されたい]。それ自身では *o*-ニトロベンジル基は、タグおよ

び被検体間の連結基の続いての結合のための更なる官能化が欠けている。商業的に入手可能なものは化合物5-ヒドロキシ-2-ニトロベンジルアルコールである。光反応活性性を有意に減少させることなく5、4位にOMe基を付加させることができることが知られている（Pillai 総説参照）。従って、5-ヒドロキシ-2-ニトロベンジルアルコールがベンジルアルコールからのDNA合成の伸長を目的とする出発点として、および5-ヒドロキシ基でのエーテルカップリングからタグへの連結基鎖として使用された。

存在すべき官能基に必要とされることは被検体とタグの組合わさった合成を可能にすることである。従って、光切断可能な基からタグ合成のために必要とされる官能基への連結基の腕が必要とされる。組み合わせ合成が固形支持体上で実施されることもまた一層高く評価される。このように、連結基の腕は官能基が二価でなければならず、選択的な合成的変換を可能にするため直交する保護基を持っている。好適なタグ試薬はグリコール結合／エーテル結合を含んでいる。合成のため、オリゴヌクレオチドは通常3'ヒドロキシおよびコハク酸エステル結合を通して長鎖アミノCPG支持体に結合されている。このように、必要とされる官能基はアルコールであるべきと思われた。

下記の間mediate化合物が合成された。



この中間体は：

- －被検体合成のためのメトキシトリチル基（ $-\text{CH}_2\text{ODMT}$ ）；
- －光切断のためのo-ニトロ基；
- －タグ合成のためのo-tert-ブチルジフェニルシリル基（ OTBDPS ）；

－質量分析法による分析のために正に荷電した基への転換のための三級アミン基；

ーおよび支持体への結合のためのN-ヒドロキシスクシンイミジル基を持つ芳香族連結基を含んでいる。

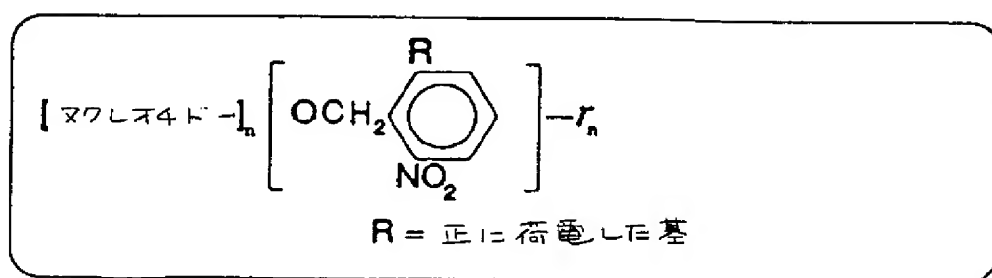
被検体がペプチドである場合、条件の少しの変更しか考えなくて良い。2-ニトロベンジル基はペプチド合成のほとんどの条件下で安定であり、それおよび関連する類似体はペプチド合成においてすでに光反応活性基として使用されている（P i l l a i の総説およびそこに含まれている文献を参照されたい）。異なった切断様式によるペプチド合成に適したいくつかの樹脂が存在する。被検体およびタグ合成のための直交保護基はt-ブトキシカルボニルおよび2-メトキシエトキシメチルに基づいているであろう。t-ブトキシカルボニル基はトリフルオロ酢酸処理により影響される切断からアミノ酸のアミノ基を保護するために使用される。2-メトキシエトキシメチルはタグ形成基および上記のような1の質量相違のnアルキルジオール誘導体に基づいたタグの保護に使用されるであろう。t-ブトキシカルボニル基の切断は2-メトキシエトキシメチル保護基と合致することが示されている。2-メトキシエトキシメチル保護基はジクロロメタン中、臭化亜鉛により選択的に切断できる。本方法を上に例示してきたが、当業者は直交保護基のこの組は代表的な例として出されたものであり、それによって制限されるわけではないことを認識するであろう。

レポーターの検出および分析

光切断は被検体からのタグの放出に好ましい方法である；迅速であり、乾燥状態で実施でき、および非常に小さい規模での画像化に走査型レーザーが使用でき、すなわち細胞内の様相を画像化するのに十分に小さいので（d e V r i e s ら、1992）、提案された方法は細胞の表面または内部または組織切片中の異なった細胞の”染色”に使用された特異的被検体（例えば候補薬剤などのようなリガンドとそれらの受容体間の相互作用の画像化に必要とされるであろうもの）の位置を検出するのに使用できる。

光感受性保護基は非常に広い範囲の化学残基に利用可能であろう（P i l l a i の総説、1980）。広い範囲の化合物に対して保護基として使用できる光反応活性o-ニトロベンジル基は考えられる多くの被検体（中でもペプチドおよび

オリゴヌクレオチド)のための連結基の理想的出発物質である。オリゴヌクレオチドを例にとると、定量的に分解できてヒドロキシ基を与える光感受性連結基が提供される。これは以下の配列決定法に記載されるように脱保護オリゴヌクレオチドのライゲーション伸長を起こすことを可能にするであろう。さらに、この基はオリゴヌクレオチド合成の間は安定であることが知られている。タグ合成を開始するために使用できる基を与えるためにベンジル環を修飾する必要がある；上記のオリゴエチレングリコール系列のようなレポーターは α -ニトロベンゾイル基の光化学切断反応を妨害しない(Pillai 前掲文献中に)。切断を促進する他の基を芳香環に加えることができる；そのような基は質量分析計での分析を簡単にするための荷電基の付加に利用できるであろう。現在の質量分析計は100分の1ダルトンより高い分離能で、全質量200kDまでを数百分子で測定できる。好適な光反応活性連結基は以下のように表現できるであろう；正に荷電した基Rは芳香環に直接結合されているか、または連結基の腕の一つに存在してもよい。



計測

提案された分子タグは質量分析法のいくつかの型の一つで分析されるであろう。被検体からタグを切断するのが望ましいであろうが、多くの目的にはタグを断片化する必要はないであろうし、そのことは曖昧さのもとになるので実際には望まれないであろう。質量分析計の最近の進歩は多くの断片化をしなくても非常に大

きな分子の測定が可能であり；および残りのタグが安定な条件下で容易に切断できるように連結基を設計することが可能であるので、測定のためのタグ断片化は避

けられるべきである。ほとんどの場合、被検基はタグより揮発性が低いであろうし、および多くの応用では固形基質に結合されているであろうので質量分析法を妨害しない。

上に例示した連結基はほとんど大多数の共有結合の切断を起こさない条件下、光子照射に対して非常に反応活性である。適した装置はすでに記載されている (de Vriesら、1992)。これは1 μ mより小さな点に焦点を合わせることができるレーザーを使用している。250 mmまでの画像が台を0.1 μ m間隔で動かしてスキャンできる。

この装置はまた脱離レーザーにより持ち上げられた化学種と相互作用させるように台の表面を横切ってイオン化レーザーを放つことにより測定されるべき標本のイオン化が可能である。このことは、もしタグ中に荷電残基を含ませることが不可能であったならば、またはタグの読みとりに断片化が望まれるならば本方法に有用でありうる。

別の態様において、本発明は標的核酸の配列決定法を提供し、その方法は以下の工程を含んでいる：

- a) 支持体上に固定化されたオリゴヌクレオチドを提供し、
- b) 標的核酸と固定化オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、
- c) ライブラリーの第一の試薬のオリゴヌクレオチド鎖が固定化オリゴヌクレオチドに隣接する標的核酸にハイブリダイズするようにb)からのハイブリッドと、定義したように試薬が溶液中と一緒に混合されているライブラリーをインキュベートし、
- d) 隣接するオリゴヌクレオチドをライゲーションし、このようにライゲーションされた第一の試薬を形成させ、
- e) 他の非結合試薬を除去し、および
- f) 標的核酸の最初の部分の配列を示すものとして、ライゲーションされた第一の試薬のタグ部分を回収し分析する。

応用例

核酸分析においてコードされたオリゴヌクレオチドが使用できる方法を参照す

ることにより応用の可能性を例示する。

1. 累進的ライゲーションによる核酸配列の決定。(図4)

決定されるべき配列は最初に工程b)で固形支持体に結合されたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる。もし配列決定されるべきDNAがバクテリオファージM13のような一本鎖ベクターにクローン化されていたら、固形支持体上の”プライマー”オリゴヌクレオチドはベクター配列の一部であるように選ぶことができる。工程c)において、工程b)からのハイブリッドを運ぶ固形支持体をコードされたオリゴヌクレオチド試薬の溶液とインキュベートする(例えば、与えられた長さのすべての配列、4096のヘキサヌクレオチド(一般には 4^n の n -mer)の前記のライブラリーと)。工程d)において、標的DNAの最初の六つの塩基と相補的なヘキサヌクレオチドが固定化プライマーオリゴヌクレオチドに連結されるようにリガーゼが導入される。この工程によりライブラリーからの第1のコードされたオリゴヌクレオチド試薬が、そのオリゴヌクレオチド鎖の固定化プライマーオリゴヌクレオチドへのライゲーションにより連結され、ここではライゲーションされた第一の試薬と称される。

工程e)において、例えば洗浄によりライゲーションされていない試薬が除去される。工程f)において、結合ライゲーションされた第一の試薬の連結基がタグ鎖を離すために破壊され、タグ鎖は回収されて標的DNAの第1の部分の配列の指標として分析される。

好適には、連結基の除去はまた第1のオリゴヌクレオチド鎖の末端のヒドロキシまたはリン酸基を露出させ、第二の試薬のオリゴヌクレオチド鎖との結合に利用可能にする。光化学的および酵素的および化学的加水分解を含む連結基分解のためのいくつかの方法はさらなる結合のために必要とされる3'-ヒドロキシルまたは5'-リン酸基の発生に使用できる。次に工程c)、d)、e)およびf)を繰り返す。これらの工程にはライブラリーからの第二の試薬のハイブリッド形成、ライゲーション、ライゲーションされた第二の試薬のタグの回収および分析、およびさらなるライゲーションのために必要とされる別の3'-ヒドロキシルま

たは5'-リン酸基の発生を含んでいる。この過程は全DNA配列が読み取られるまで、または反応の収率が非常に低くなって有効でなくなるまで繰り返すことができる。

この系列の四つの段階は図式的に図4に示されている。最初の図は一回目の工程e)の最後の状態に対応している。第二の図は工程f)の最後の状態に対応している。第三の図は二回目の工程e)の最後の状態に対応している。第四の図は二回目の工程d)の最後の状態に対応している。本技術の循環的性質が示されている。

2. 連続的ライゲーションによる多数の鋳型の核酸配列決定

第一の例を拡大して、多くの配列が同時に分析できるであろうことが考えられる。例えば、配列決定されるべきDNAの個々のクローンが固定化できるであろう：

a) 各々の末端に固定化された同一のベクターオリゴヌクレオチドを持つ針のアレイが使用できる。標的DNAの個々のクローンを各々の個々の針に固定化されたオリゴヌクレオチドへハイブリダイズさせる。次にこれらのハイブリッドを運ぶ針のアレイはコードされたオリゴヌクレオチド試薬のライブラリー溶液（ライゲーションのための成分も含んでいる）とインキュベートする。この工程の結果、各々の針は異なったライゲーションされた試薬を運んでいる。最後に、前記のように各々のライゲーションされた試薬のタグ鎖を回収し分析する。もしアレイの針が適切に配置されていたら、それらはマイクロタイタープレートのウェル内へ浸してもよく、第一のプレートは配列決定されるべき鋳型を含んでおり、第二のプレートは試薬のライブラリーおよびライゲーション溶液、および第三のプレートは針からタグ鎖を切断するための試薬を含んでいる。

b) もしくは、表面がプライマーオリゴヌクレオチドで被覆されていてもよく、好適にはその5'末端またはさもなくばいくつかの他の場所を通して共有結合で結合されている。配列決定されるべきDNAの個々のクローンを被覆された支持体上の離れた位置へスポットし、標的DNAの各々の個々のクローンが支持体上の個々の離れた位置で固定化されたオリゴヌクレオチドへハイブリダイズするよ

うにする。支持体は次に試薬のライブラリーおよびライゲーションのための成分を含んだ溶液とインキュベートする。非結合試薬を除去する。続いて各々離れた位置のライゲーションされた試薬の連結基を切断し、タグを回収し分析する。切断は表面の小さな領域に向けることができるレーザー脱離のような方法により好適に達成される。この方法の利点は非常に多数のDNA配列が一緒に分析できることである。

3. オリゴヌクレオチドへのハイブリッド形成による配列決定のための伸長法

a) 型 I

膜上に高濃度でDNAをスポッティングする方法はよく確立されている (H o h e i s e l ら、1992; R o s s ら、1992)。フィンガープリンティングおよび配列決定のためには、ハイブリッド形成パターンが解釈するには複雑すぎないようにオリゴヌクレオチドは単一でまたは小さな組で適用されなければならない; その結果、分析の各々の回では鋳型の少しの比率しか信号を与えない。各々のハイブリッド形成からの信号が配列の決定を可能にするコード情報を含んでいたら、より複雑な混合物が使用できハイブリッド形成の各々の回でより多い情報が集められる。混合物の複雑さはDNA鋳型の長さおよび混合されたオリゴヌクレオチド中の配列を分割する分析法の能力に依存しているであろう。

これらの質量分析法タグまたはレポーター基でコード化された核酸プローブは多プローブの使用が便利である場合 (例えば、DNAフィンガープリンティングまたは突然変異分析) に非常に有用であろう。質量分析法タグは多重送信の利点を提供する。

各々が自身の独特で適切な質量分析法タグで標識された多数の異なったプローブは典型的な核酸ハイブリッド形成アッセイと一緒に使用できる。ハイブリダイズする各々の個々のプローブの配列は、質量分析におけるタグの分離および分割のため他のものの存在下で特異的に決定できる。

この態様において、本発明は標的核酸の配列決定法を提供し、この方法は以下の工程を含んでいる;

i) 支持体上に固定化された標的核酸を用意する。好適には、標的核酸の

個々のクローンは支持体上離れた位置に固定化されている。

i i) 異なった試薬のオリゴヌクレオチド鎖が支持体上の標的核酸にハイブリダイズするように i) からの固定化された標的核酸と上記の多数のコードされたオリゴヌクレオチド試薬をインキュベートし、

i i i) ハイブリダイズしていない試薬を除去し、および

i v) 標的核酸の一部の配列の指標として各々の試薬のタグ部分を回収して分析する。

好適にはその後、試薬のライブラリーをハイブリッド形成に使用し、ライゲーション、切断および分析工程を循環的に繰り返し、標的核酸の配列についての追加の情報が提供される。

b) 型 II

オリゴヌクレオチドのアレイへハイブリダイズした場合、形成されたデュープレックスのパターンから核酸配列を決定することが可能である。決定できる配列の長さは大体アレイの大きさの平方根であり；もし全部で65, 536のオクタンヌクレオチドのアレイが使用されたならば、決定されるべき配列は約200bpであろう (Southernら、1992)。大きさの制限は、決定されるべき配列において8塩基の並びが2度以上生じてはならない束縛により課せられている。アレイおよび配列決定におけるその使用は国際特許出願WO89/10977に記載されており；固定化された（例えば、表面上にそれらの5'-末端またはそれらの3'-末端により）オリゴヌクレオチドのアレイを提供する方法は国際特許出願WO90/03382に記載されている。

本発明の方法によると決定できる配列長を非常に長くすることができる。本発明のこの態様において、本方法は以下の工程を含んでいる：

a) 支持体上の間隔をとった位置に固定化されたオリゴヌクレオチドのアレイを提供し、一つの位置のオリゴヌクレオチドは別の位置のオリゴヌクレオチドと異なっている。好適には支持体上の各々間隔をとった位置に共有結合で固定されているオリゴヌクレオチドの配列が知られている、

b) 支持体上の一つまたはそれ以上の間隔をとった位置でハイブリッドを形成

するように標的核酸と固定化オリゴヌクレオチドのアレイをインキュベートし、

c) ライブラリーの試薬のオリゴヌクレオチド鎖が各々の固定化されたオリゴヌクレオチドに隣接する標的核酸にハイブリダイズするようにb)からのハイブリッドとコードされたオリゴヌクレオチド試薬のライブラリーをインキュベートし、

d) 隣接するオリゴヌクレオチドをライゲーションし、このことにより支持体上の一つまたはそれ以上の間隔をとった位置でライゲーションされた試薬を形成し、

e) 他のライゲーションしていない試薬を除去し、および

f) 標的核酸の一部の配列の指標として各々のライゲーションされた試薬のタグ部分を回収して分析する。

好適には、各々間隔をとった位置のタグ鎖の切断はレーザーにより光化学的に達成される。好適には、タグ鎖の分析は質量分析法による。好適には上記のように、標的核酸の配列についての追加の情報を得るためにハイブリッド形成、ライゲーション、切断および分析工程が循環的に繰り返される。

好適な操作の順番は図5を構築する四つの図に示されている。最初の図は工程b)の出発時の状態を示している。第二の図は工程b)の最後の状態を示しており、標的核酸の一部がアレイの一部を形成している繋がれたオリゴヌクレオチドへハイブリダイズしている。第三の図は工程c)の最後の状態を示しており、第四の図は工程d)の最後の状態を示しており；ライブラリーからの試薬が標的核酸にハイブリダイズされ、固定化オリゴヌクレオチドにライゲーションされた。

既知の方法のこの伸長の結果は劇的である。タグを読み取るのに用いられる方法が混合物を分離することができれば、アレイ中のオリゴヌクレオチドの長さに等しい長さ分の一回の伸長は、読みとることができる全部の長さと一致している。この場合、八つの塩基により伸長されたオクタヌクレオチドの配列から読みとることができる長さは約60,000塩基である。

タグを付けたオリゴヌクレオチドを含むハイブリッド分析と下記の方法の比較：

a) ゲルに基づく方法

自動化配列分析について最も進歩した装置は一日当たり約40000塩基を読みとることができる。これはゲルに加えられる反応液を提供するのに必要な生物学的および生化学的過程のための時間は含まれていない。もし鋳型を表面にミリメートル平方当たり1の密度で適用できると仮定すると(Hoheiselら、1992; Rossら、1992)、100×100mmの領域に10000を適用できるであろう。ハイブリッド形成後、各々のセルのタグを付けたオリゴヌクレオチドは数fモルであろうので、レーザーの一回の2ナノ秒パルスは読みとりに十分なタグを放出するであろうが、たとえ100のパルスが必要とされると仮定しても、読みとられるべきセルに対しての総時間は数ミリ秒であり、したがって10000のセルすべてを数分間で読み取ることができる。もしオリゴヌクレオチドがヘキサマーであったとしても、得られた生のデータは60000塩基であろう。配列決定に対して、このことはゲルからの等しい生データほど情報が豊かではないであろう、なぜなら、より長い連続的な長さがゲルから読みとられるからである。ゲルにおけるこの利点は、もちろん、もしアレイから読まれた配列がそれ以上の回数の分析により伸長できるならば失われるであろう。しかし、アレイに基づいた方法の基本的利点は、数千の鋳型を一緒に分析することを可能にする平行法であり；ゲル上で分析できる数はゲルの巾により制限され、15未満である。

b) 現在のアレイに基づく方法

現存のアレイに基づく方法の主たる欠点は：

- a) 大きさNのアレイから読むことができる配列は $\approx \sqrt{N}$ のみであり、アレイのほとんどのセルは空である。タグを付けたオリゴヌクレオチドを加えることにより、アレイの占拠率はほとんど完全に近くなり、そのためほとんどのセルから情報が得られるであろう。この理由はタグからの付加的な情報が、標的配列中に短い列が多く存在することによる曖昧さを除く助けとなるからである(表3)。
- b) ハイブリッド形成によるオリゴヌクレオチドとの各々の相互作用から読み取れる配列の長さは必然的にオリゴヌクレオチドの長さに制限される。このことは単一塩基の並びのような繰り返し配列の読みとりに問題を起こしている。ライゲー

ションによる読みとりの拡大は繰り返されたライゲーションにより通過できるかぎり読みとりを可能にするであろう。

c) 現在の検出法のうち、放射能は高い感度を持っているが分解能が悪く、蛍光は低い感度と高い分解能を持っている；両方とも比較的遅い。質量分析法を使用する案は分解能、速度および感度を改良でき、ならびにタグの配列を読みとる可能性を加えた。

表3 一般に、空間的に区分されたアレイ上に分配された鑄型から決定できる配列は $\sqrt{4^L} = 2^L$ である、式中Lはオリゴヌクレオチドにより読まれた連続した長さの合計である。実施例3bでは固形支持体上のオリゴヌクレオチドの長さを含んでいるであろうが、実施例2では含まれていない。

L	2^L
12	4096
14	16384
16	65536
18	2262144

薬理活性の可能性を持つ被検体

多くの薬剤は組織特異的である。それらの作用はしばしば細胞表面レセプターとの相互作用に依存している。コア構造に基づいた薬剤の一群がある；例えば、短いペプチドを含むいくつかのもの。候補薬剤を追跡してどの細胞または組織を標的としているのかを観察できることは有用である。多くの異なった候補を同時に追跡できることは有用であろう。コードされた質量タグでタグを付けた被検体のライブラリーを用いると、質量分析計中で細胞または組織を試験することにより相互作用を追跡することが可能であろう。もしタグに光反応活性保護基が結合されているとしたら、質量分析計と組み合わされた走査レーザー切断を用いて動物全体または組織切片を画像化できるであろう。

以下の実施例は本発明をさらに例示している。

実施例1から6は、被検体合成のためのメチルオキシトリチル基 ($-\text{CH}_2\text{O}-\text{DMT}$) ; 光切断のための o -ニトロ基 ; タグ合成のための O - t -ブチルジフェニルシリル基 (OTBDPS) ; 質量分析法による分析のための正に荷電した基への変換のための三級アミノ基 ; および支持体への結合のための N -ヒドロキシスクシンイミジル基を有する芳香族連結基を含む化合物 (8) の合成における反応スキーム1に従った工程を示している。

実施例7および8は反応スキーム2に従った続いての工程を示している。

実施例9および10は反応スキーム3に従った、プロパン-1, 3-ジオールに基づいたレポーター基 (13) を合成する工程を示している。

実施例11から13は反応スキーム4に従った、レポーター基としての保護プロパン-1, 3-ジオール残基の化合物 (6) への結合に関与する工程を示している。

実施例14から19は本発明に従った種々の試薬の調製、特徴づけおよび使用を記載している。

一般的項目

5-ヒドロキシ-2-ニトロベンジルアルコールは、Aldrich社より購入し、長鎖アルキルアミノ制御孔ガラスはSigmaより購入した。無水溶媒は、窒素雰囲気下で包装したAldrich Sure Seal等級のものである。トリエチルアミンは水素化カルシウムから前蒸留し、使用まで窒素雰囲気下に保存した。他の溶媒および試薬は、市販の範囲のものから入手可能である。

^1H -NMRは、Jeol 270MHz機器で、指示された溶媒を用い、テトラメチルシランを参照として得た。

赤外吸収は、Nicolet 5DXC F.T. IR機器で、指示されるように、臭化カリウムディスクまたはクロロホルム溶液として得た。

融点は、Gallenkamp融点装置を用いて求め、修正しなかった。

TLCは、指示された溶媒系を用いて、Kieselgel 60F₂₅₄アルミニウム裏張TLCプレートで行った。プレートは、紫外線および／またはモリブドリン酸の3%w/vエタノール性溶液に浸漬し次にホットエアガンで加熱す

ることの両方により可視化した。トリチル含有種は明るいオレンジ色のスポットとして、アルコールは青いスポットとして現れる。

シリカゲルクロマトグラフィーは、粒子サイズ $40 \rightarrow 63 \mu\text{m}$ のフラッシュ等級シリカゲルを用いて実施した。

反応スキームおよび本文中においては、次の略号を使用する。

D M T	4, 4'-ジメトキシトリチル
T H F	テトラヒドロフラン
T B D P S	tert-ブチルジフェニルシラン
D M A D	4-ジメチルアミノピリジン
D C C I	ジクロロヘキシルジカルボジイミド
CH_2Cl_2	ジクロロメタン
C P G	制御孔ガラス
M e l	ヨードメタン
T r e s y l	2, 2, 2-トリフルオロエチルスルホニル

実施例 1

5-ヒドロキシ-O-(4, 4'-ジメトキシトリチル)-2-ニトロベンジルアルコール(化合物2、スキーム1)の合成

無水ピリジン(40 ml)に溶解した5-ヒドロキシ-2-ニトロベンジルアルコール(5.11 g, 30.2 mmol)に、塩化4, 4'-ジメトキシトリチル(10.25 g, 30.2 mmol)を加え、フラスコに栓をした。次に、反応混合物を室温で合計72時間攪拌した。TLC分析(エーテル/石油エーテル40-60℃, 65%/35%)は、 $R_F = 0.27$ の新たなトリチル陽性含有物質の存在および出発アルコールの消失を示した。次に、回転蒸発によりピリジンを除去し、最後の痕跡量はトルエンとの共蒸発($\times 2$)により除去した。得られたガムを酢酸エチルに溶解し、溶液を水($\times 1$)およびブライン($\times 1$)で洗浄した。次に、酢酸エチル溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて、赤茶色ガムを得た。ガムを CH_2Cl_2 (20 ml)に溶解し、次にシリカゲルカラム(14 cm \times 6.5 cm)にかけ、エーテル/石油エーテル40-60℃

、65% / 35%で溶出した。生成物分画を合わせ、回転蒸発により溶媒を除去して、灰白色固体を得た(13.49 g, 95%, mp. 80-82°C (分解))。分析用試料は、クロロホルム / 石油エーテル40-60°Cから再結晶することにより調製した。mp. 134-7°C (分解)。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 3.79 (s, 6H, DMT-OCH_3), 4.63 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-ODMT}$), 6.77-6.85 (m, 5H, アリール), 7.22-7.49 (m, 9H, アリール), 7.63 (s, 1H, アリール), 8.06 (d, 1H, $J=9.06\text{ Hz}$, アリール)。
 IR (KBr ディスク): 1610, 1509, 1447, 1334, 1248, 1090, 1060, 1033, 828 cm^{-1} 。

実施例 2

0-(4,4'-ジメトキシトリチル)-5-[1-(3-ブロモ-1-オキシプロピル)]-2-ニトロベンジルアルコール(化合物3、スキーム1)の合成
 アセトン(150 ml)に溶解した化合物2(10.18 g, 21.6 mmol)

1)に、1,3-ジブロモプロパン(11 ml, 108 mmol)および炭酸カリウム(4.47 g, 32.3 mmol)を加えた。次に、反応混合物を80°Cで合計3時間加熱し、次に室温でさらに16時間撹拌した。TLC分析(エーテル / 石油エーテル40-60°C, 60% / 40%)は、出発材料が完全に消失し、 $R_F=0.48$ (メジャー) および $R_F=0.23$ (マイナー) の2つの新たなトリチル含有物質の形成を示した。次に、回転蒸発によりアセトンを除去し、得られた残渣を水とジクロロメタンとの間に分配した。ジクロロメタン溶液を分離し、ブライン(×1)で洗浄した。次に、ジクロロメタン溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させてガムを得た。ガムをジクロロメタン(20 ml)に溶解し、次にシリカゲルカラム(6.5 cm × 14 cm)にかけ、エーテル / 石油エーテル40-60°C, 60% / 40%で溶出した。純粋生成物分画を合わせ、回転蒸発により溶媒を除去して、化合物3を白色固体として得た(8.18 g, 64%, mp. 132→4°C, $R_F=0.48$ エーテル / 石油エーテル40-60°C, 60% / 40%)。分析のために、少量の試料を酢酸エチル / 石油エー

テルから再結晶した。mp. 132-4℃。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 2.40 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.64 (t, 2H, $J=6.32\text{ Hz}$, CH_2Br), 3.79 (s, 6H, OCH_3), 4.27 (t, 2H, $J=6.04\text{ Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 4.66 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.84 (d, 4H, $J=8.79\text{ Hz}$, DMTアリアル), 7.20-7.50 (m, 10H, 9 DMTアリアル、1 アリアル), 7.68 (s, 1H, アリアル), 8.1 (d, 1H, $J=9.06\text{ Hz}$, アリアル)。

IR (KBr ディスク): 1608, 1577, 1511, 1289, 1253, 1230, 1174, 1065, 1030 cm^{-1} 。

実施例 3

N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-2-オキシエチル]-N-(2-ヒドロキシエチル)アミン(化合物5、スキーム1)の合成

水素化ナトリウム(油中60%分散液0.76 g, 19 mmol)に、 N_2 雰

囲気下で無水THF(15 ml)を加え、次に、水素を発生させるような速度でTHF(30 ml)中のジエタノールアミンのスラリー(2 g, 19 mmol)を加えた。次に、反応混合物を N_2 雰囲気下で室温で30分間攪拌し、この間に灰色の析出物が形成した。tert-ブチルクロロジフェニルシラン(4.95 ml, 19 mmol)を加えることにより生成したアルコキシドを急冷し、次に反応液を N_2 雰囲気下で室温で攪拌した。TLC分析(酢酸エチル)は、出発物質に対して2つの新たなUV陽性スポットの生成を示した。 $R_F=0.05$ (メジャー)、 $R_F=0.60$ (マイナー)。回転蒸発によりTHFを除去し、残渣を0.1 M炭酸水素ナトリウム溶液に溶解した。次に生成物を酢酸エチル($\times 2$)で抽出した。次に酢酸エチル抽出物を合わせ、ブライン($\times 1$)で洗浄した。次に酢酸エチル溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて油状物を得た。この油状物をシリカゲルカラムにかけ、クロロホルム/メタノール、90%/10%で溶出した。 $R_F=0.33$ の分画を合わせ、回転蒸発させて、化合物5を白色結晶質固体として得た(3.93 g, 60%)。mp. 73→75℃。分

析のために、少量の試料を酢酸エチル／石油エーテル40-60℃から再結晶した。mp. 76→77℃。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.06 (s, 9H, ^tBu), 2.13 (br s, 1H, OH , D_2O 交換可能), 2.78 (m, 4H, CH_2NHCH_2), 3.63 (t, 2H, $J=5.22\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{OSi}-$), 3.78 (t, 2H, $J=5.22\text{ Hz}$, CH_2OH), 7.40 (m, 6H, アリール), 7.66 (m, 4H, アリール)。

IR (KBrディスク): 3100, 1430, 1114, 1080, 969, 749, 738, 707 cm^{-1} 。

実施例4

N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4-ニトロフェニル)-3-オキシプロピル]-N-(2-ヒドロキシエチル)アミン(化合物6、スキーム1)の合成

1-メチル-2-ピロリジノン(65 ml)中に溶解した化合物3(7.46 g, 12.6 mmol)に、化合物5(8.63 g, 25.2 mmol)を加えた。次に、反応混合物を80℃で合計5時間加熱し、放置して冷却させ、室温でさらに16時間攪拌した。TLC分析(酢酸エチル)は、 $R_f=0.51$ の新たなトリチル含有種の形成および残余量の2つの出発物質を示した。反応混合物を水(600 ml)とブライン(100 ml)との混合物中に注ぎ、生成物を酢酸エチル(3×200 ml)で抽出した。次に、酢酸エチル抽出物を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。次に、回転蒸発により酢酸エチルを除去して、茶色ガムを得た。このガムから、結晶質生成物がゆっくり形成した。結晶質生成物(化合物5の臭化水素塩)を濾過しうるように、最少量の酢酸エチルを加えて残渣ガムを溶解した。次に、酢酸エチル溶液をシリカゲルカラム(13 cm×6.5 cm)にかけ、酢酸エチルで溶出した。このカラムでは、残余の化合物3と所望の生成物との分離が不十分であったため、生成物分画を合わせ、蒸発させてガムを得た。このガムを必要最少量の酢酸エチルに溶解し、別のシリカゲルカラム

(14 cm × 6.5 cm) にかき、最初に酢酸エチル／石油エーテル 40-60℃, 50% / 50% で、次に酢酸エチルで、勾配溶出を用いて溶出した。生成物分画を合わせ、回転蒸発により溶媒を除去して、化合物 6 をガムとして得た。最後の痕跡量の溶媒は、ガムを高真空下に 1 時間置くことにより除去した。生成物の収量は 7.64 g, 71% であった。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.04 (s, 9H, tBu), 1.97 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.7 (m, 6H, NCH_2), 3.56 (m, 2H, CH_2OH), 3.75 (m, 2H, CH_2OSi), 3.78 (s, 6H, DMT-OCCH_3), 4.12 (m, 2H, $\text{ArOCCH}_2\text{CH}_2$), 4.64 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.74-6.85 (m, 5H, アリール), 7.2-7.65 (m, 20H, アリール), 8.05 (d, 1H, アリール)。

IR (KBr ディスク): 1608, 1579, 1509, 1287, 1251, 1232, 1112, 1092, 1064, 1035, 826, 754, 703, 613 cm^{-1} 。

実施例 5

N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4-ニトロフェニル)-3-オキシプロピル]-N-[O-(3-カルボキシラートプロピオニル)-2-オキシエチル] アミン (化合物 7、スキーム 1) の合成
無水ジクロロメタン (40 ml) および無水ピリジン (50 ml) に溶解した化合物 6 (5.64 g, 6.59 mmol) に、コハク酸無水物 (2.06 g, 20.6 mmol) およびジメチルアミノピリジン (210 mg, 1.72 mmol) を加え、フラスコに栓をした。次に、反応混合物を室温で合計 72 時間撹拌した。TLC 分析 (メタノール／酢酸エチル、10% / 90%) は、 $R_f = 0.45$ の新たなトリチル含有種の形成および出発物質の消失を示した。回転蒸発により溶媒を除去し、トルエンとの共蒸発 (×2) により最後の痕跡量のピリジンを除去した。次に、得られたガムをクロロホルムと水との間に分配した。有機

相を分離し、水相をさらにクロロホルム(×1)で抽出した。次に、有機相を合わせ、ブライン(×1)で洗浄した。次に、クロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させてガムを得た。次に、ガムを高真空下に1時間置くことにより最後の痕跡量の溶媒を除去し、化合物7を得た。6.75 g。この生成物を、さらに精製することなく次の段階で用いた。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.0 (s, 9H, tBu), 1.9 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.5 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.7 (m, 6H, N-CH_2), 3.7 (m, 2H, CH_2OSi), 3.75 (s, 6H, DMT-OCCH_3), 4.1 (m, 4H, CH_2OCO および $\text{Ar-OCCH}_2\text{CH}_2$), 5.6 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.7 (d, 1H, アリール), 6.8 (d, 4H, アリール), 7.2→7.7 (m, 20H, アリール), 8.02 (d, 1H, アリール)。

IR (CHCl_3 溶液): 1736, 1608, 1579, 1509, 1288, 1251, 1232, 1175, 1158, 1112, 1093, 1065, 1035, 755, 703 cm^{-1} 。

実施例6

N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4-ニトロフェニル)-3-オキシプロピル]-N-[(O-(スクシニル(3-カルボキシラートプロピオニル)))-2-オキシエチル]アミン(化合物8、スキーム1)の合成

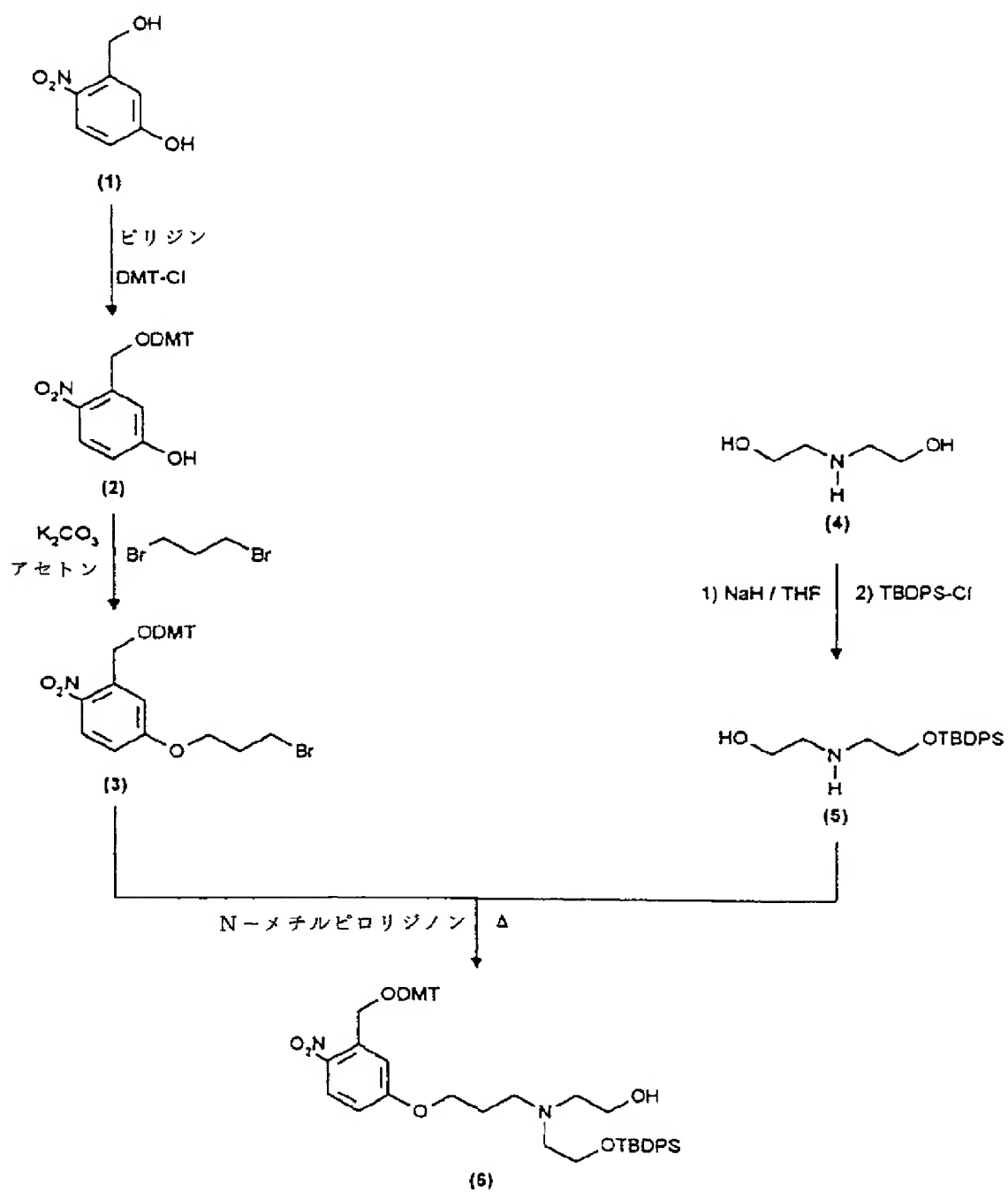
無水ジクロロメタン(30 ml)に溶解した化合物7(2.99 g, 3.13 mmol)に、ジクロヘキシルカルボジイミド(0.710 g, 3.45 mmol)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(0.396 g, 3.44 mmol)を加え、フラスコに栓をした。次に、反応混合物を室温で18時間攪拌し、この間に白色析出物が形成した。白色析出物を濾別し、ジクロロメタン溶液を水(×1)およびブライン(×1)で洗浄した。次に、ジクロロメタン溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を回転蒸発させて、泡状物3.26 g(99%)

を得た。TLC分析（酢酸エチル）は、 $R_F = 0.74$ の唯一のトリチル含有種を示し、有意の混入物はなかった。少量の物質をシリカゲルカラムに通すことにより、分析用試料を得ようと試みたが、活性エステルが分解して酸に戻った（化合物7）。したがって、この物質をさらに精製することなく、以下のすべての実験において用いた。

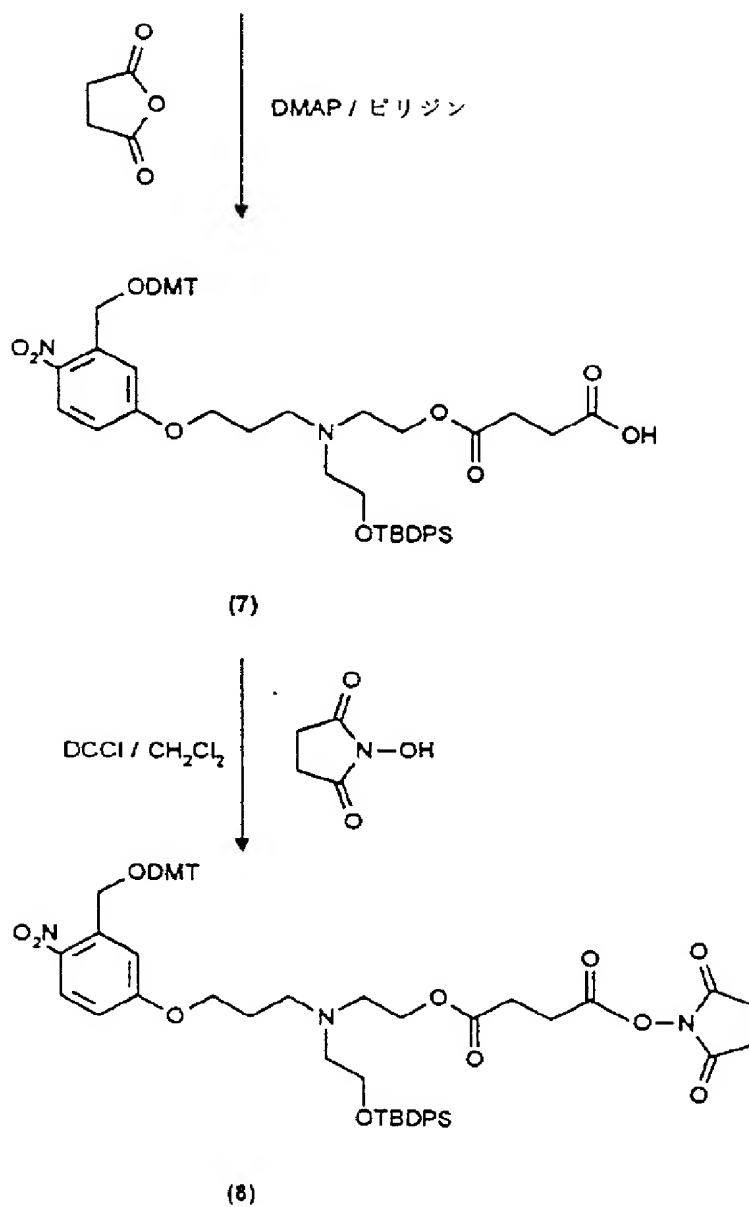
$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.04 (s, 9H, tBu), 1.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.50→2.75 (m, 6H, スクシニル CH_2 + $-\text{OCCCH}_2$), 2.76–2.86 (m, 6H, NCH_2), 3.08 (m, 2H, CH_2CO_2 スクシニル), 3.77 (s, 6H, DMT OCH_3), 3.86 (m, 2H, CH_2OSi), 4.1→4.2 (m, 4H, $\text{Ar OCH}_2 + \text{CH}_2\text{O}_2\text{C}$), 4.63 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.7→6.9 (m, 5H, アリール), 7.01→7.7 (m, 20H, アリール), 8.05 (d, 1H, アリール)。

IR (KBr ディスク): 1742, 1713, 1509, 1288, 1251, 1211, 1175, 1090, 1067 cm^{-1} 。

スキーム1



スキーム1 (続き)



実施例 7

誘導化長鎖アルキルアミノ制御孔ガラス（化合物 9、スキーム 2）

長鎖アルキルアミノ制御孔ガラス（Sigma Chemical Co. 3.5 g）を、ジクロロメタン（50 ml）に溶解したトリクロロ酢酸（1.5 g）を、

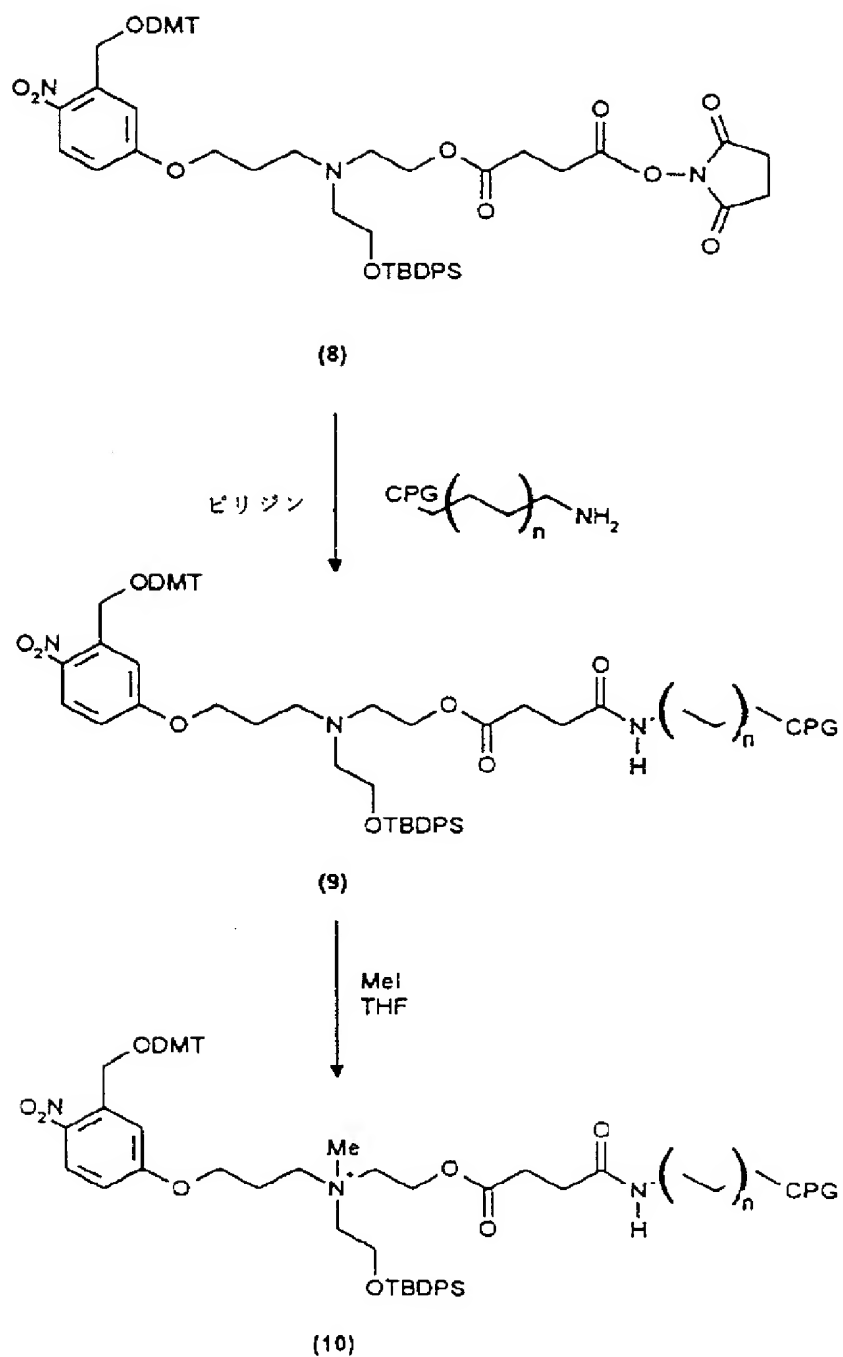
）で2.5時間前処理し、ジクロロメタン（総量100ml）および無水エーテル（総量100ml）のアリコートで洗浄し、真空下に乾燥した。次に、CPG支持体に、無水ピリジン（35ml）、ジメチルアミノピリジン（42mg, 344 μ mol）、トリエチルアミン（280 μ l, 201mmol）および化合物8（スキーム1を参照のこと）（736mg, 700 μ mol）を加えた。次に、混合物を合計18時間穏やかに攪拌し、その後、ビーズをピリジン（7 \times 10ml）、メタノール（5 \times 15ml）およびクロロホルム（5 \times 15ml）で多数回洗浄し、次に真空下に乾燥した。

実施例8

CPG支持体に結合した第3アミノ基のメチル化（化合物10、スキーム2）

誘導化長鎖アルキルアミノ制御孔ガラス（化合物9、スキーム2）（1.01g）に、無水THF（10ml）およびヨードメタン（0.5ml, 8mmol）を加えた。次に、混合物を合計18時間穏やかに攪拌し、その後、ビーズを無水THF（5 \times 10ml）で多数回洗浄し、次に真空下に乾燥した。

スキーム2



実施例9

モノ保護1,3-プロパンジオール誘導体の合成(化合物12aおよび12b、スキーム3) - 一般的方法

N₂雰囲気下で、水素化ナトリウム（油中60%分散物1.05g, 26.3 mmol）に、無水THF（10ml）を加え、続いて無水THF（20ml）に溶解した1,3-プロパンジオール誘導体（26.3 mmol）を滴加した。さらにN₂雰囲気下で30分間攪拌して、灰色析出物の形成により示されるアルコキシド形成を確実にした。無水THF（20ml）に溶解したtert-ブチルクロロジフェニルシラン（7.24g, 26.3 mmol）を滴加することにより生成したアルコキシドを急冷し、反応混合物をN₂雰囲気下でさらに40分間攪拌した。次に、回転蒸発によりTHFを除去し、残渣をジクロロメタンと0.1M炭酸水素ナトリウム溶液との間に分配した。ジクロロメタン溶液を分離し、ブライン（×1）で洗浄した。次に、ジクロロメタン溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、蒸発させて油状物を得た。この油状物をシリカゲルカラム（16cm×5cm）にかけ、エーテル／石油エーテル40-60℃、30%/70%混合物で溶出した。生成物分画を合わせ、回転蒸発させて、所望の1,3-プロパンジオール誘導体を得た。

化合物の個別の詳細は以下のとおりである。

1.2a 1-O-tert-ブチルジフェニルシリル-1,3-プロパンジオール、白色結晶質固体、R_F=0.21 エーテル／石油エーテル40-60℃、30%/70%、7.61g, 92%, mp. 40→42℃。

IR（KBrディスク）：3400, 1448, 1112, 822, 734, 702, 689, 506, 488 cm⁻¹

¹H-NMR（270 MHz, CDCl₃, δ）：1.06（s, 9H, tBu）, 1.80（m, 2H, CH₂CH₂CH₂）, 2.45（t, 1H, OH）, 3.84（m, 4H, OCH₂CH₂CH₂O-）, 7.40（m, 6H, アリール）, 7.68（m, 4H, アリール）。

1.2b 2-メチル-1-O-tert-ブチルジフェニルシリル-1,3-プロパンジオール、無色油状物、R_F=0.21 エーテル／石油エーテル40-

60℃、30%/70%、6.60g, 77%。

IR（薄膜）：3400, 1472, 1428, 1087, 1040, 823,

740, 702 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 0.82 (d, 3H, $J = 6.87 \text{ Hz}$, CH_3), 1.06 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 2.0 (m, 1H, CH-CH_3), 2.68 (t, 1H, OH), 3.64 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$), 7.40 (m, 6H, アリール), 7.68 (m, 4H, アリール)。

対称1, n -ジオールのモノシリル化の一般的方法については、P. G. McDougall et al., JOC, 51, 3388 (1986)を参照のこと。

実施例10

トレスレート (t r e s l a t e) 誘導体 (化合物13aおよび13b、スキーム3) の合成一般的方法

無水ジクロロメタン (10 ml) に溶解したアルコール誘導体 (4.94 mmol) および乾燥トリエチルアミン (0.84 ml, 6.03 mmol) に、 N_2 雰囲気下で、 -15°C から -30°C に冷却して、無水ジクロロメタン (5 ml) 中の塩化トレシル (1 g, 5.48 mmol) を、20-40分間かけて滴加した。 N_2 雰囲気下で -15°C から -30°C においてさらに30分間攪拌して反応を完了させた。次に、反応混合物を分離フラスコに移し、氷冷1.0M塩酸 ($\times 1$)、氷冷水 ($\times 1$) および氷冷ブライン ($\times 1$) で洗浄した。次に、ジクロロメタン溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を回転蒸発させて、トレスレートを得た。このトレスレートは、必要となるまで N_2 下で -20°C で保存した。

化合物の個別の詳細は以下のとおりである。

13a 1-O-tert-ブチルジフェニルシリル-3-O-トレシル-1, 3-プロパンジオール, 白色結晶質固体, 1.74 g, 77%, mp. $34 \rightarrow 35^\circ\text{C}$ 。他の反応に加えるために、反応の後処理の前にこの反応混合物3mlを除去した。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.06 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.97 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.77 (t, 2H, $J = 5.4$

9 Hz, $\text{CH}_2\text{-O-Si}$), 3.84 (q, 2H, $J=8.79$ Hz, $\text{CF}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 4.54 (t, 2H, $J=6.05$ Hz, トレスルO-CH_2), 7.42 (m, 6H, アリール), 7.64 (m, 4H, アリール)。

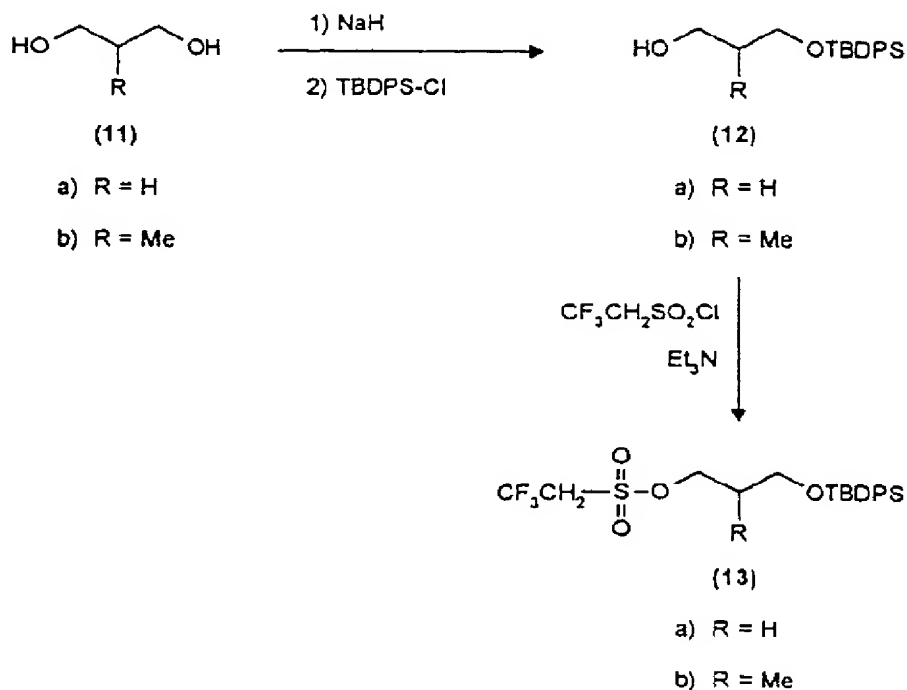
IR (KBr ディスク): 1386, 1329, 1274, 1258, 1185, 1164, 1137, 1094, 941, 763, 506 cm^{-1}

13b 2-メチル-O-tert-ブチルジフェニルシリル-3-O-トレスル-1, 3-プロパンジオール, 無色油状物, 2.57 g, 99%。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 0.97 (d, 3H, $J=6.87$ Hz, CH_3), 1.06 (s, 9H, tBu), 2.10 (m, 1H, CH-CH_3), 3.6 (m, 2H, CH_2OSi), 3.8 (q, 2H, $J=8.79$ Hz, CF_3CH_2), 4.40 (t, 2H, トレスルO-CH_2), 7.40 (m, 6H, アリール), 7.64 (m, 4H, アリール)。

トレスレートの一般的詳細については、R. K. Crossland et al., JACS, 93, 4217 (1971) を参照のこと。

スキーム3



実施例 1 1

N-[アセトキシ-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4-ニトロフェニル)-3-オキシプロピル]-N-2-ヒドロキシエチル]アミン(化合物15、スキーム4)の合成

無水THF(20 ml)に溶解した化合物11(1.72 g, 1.92 mmol)に、フッ化テトラブチルアンモニウム(THF中1 M溶液0.55 ml, 1.92 mmol)を加えた。次に、反応混合物を室温で合計2時間撹拌した。次に、反応混合物を水(50 ml)で希釈し、回転蒸発によりTHFを除去した。次に、水性溶液をクロロホルム(×1)で抽出した。有機溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、蒸発させてガムを得た。生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、カラムを酢酸エチルで溶出した。生成物分画を合わせ、回転蒸発させて、化合物12を無色ガムとして得た。これは放置するとゆっくり結晶化した。0.7

3 g, 58%, mp. 95→97°C, R_F = 0.26 酢酸エチル。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.75 (br s, 1H, OH), 2.0→2.1 (m, 5H, $\text{O}_2\text{CCH}_3 + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.70→2.81 (m, 6H, CH_2N), 3.58 (m, 2H, CH_2OSi), 3.79 (s, 6H, DMT-OCH_3), 4.17 (m, 4H, CH_2O), 4.46 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.83 (d, 4H, DMT-アリール), 7.2→7.5 (m, 10H, アリール), 7.69 (s, 1H, アリール), 8.10 (d, 1H, アリール)

IR (KBr ディスク): 3459, 1738, 1608, 1577, 1506, 1444, 1313, 1288, 1250, 1230, 1175, 1154, 1070, 1035, 984 cm^{-1}

実施例 1 2

N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4

ーニトロフェニル)ー3ーオキシプロピル]ーNー[アセトキシー2ーオキシエチル]アミン(化合物14、スキーム4)の合成

無水ピリジン(10 ml)に溶解した化合物6(1.73 g, 2.02 mmol)に、無水酢酸(0.5 ml, 4.54 mmol)および4ージメチルアミノピリジン(55 mg, 0.45 mmol)を加え、フラスコに栓をした。次に、反応混合物を室温で合計16時間攪拌した。この後、TLC分析(メタノール/酢酸エチル, 5%/95%)は、出発物質の完全な消失および新たなトリチル含有スポット, $R_f = 0.80$ の形成を示した。回転蒸発によりピリジンを除去し、最後の痕跡量はトルエン($\times 2$)との共蒸発により除去した。得られたガムをクロロホルムと水との間に分配した。クロロホルム溶液を分離し、ブライン($\times 1$)で洗浄した。次に、クロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を回転蒸発させて、無色ガムを得た。1.94 g。この物質は、さらに精製することなく次の段階で用いるのに十分純粋であった。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.04 (s, 9H, ^tBu)

1.9 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.01 (s, 3H, $-\text{O}_2\text{CCH}_3$), 2.74 (m, 6H, CH_2N), 3.7 (m, 2H, CH_2OSi), 3.8 (s, 6H, $\text{DMT}-\text{OCH}_3$), 4.1 (m, 4, CH_2O), 4.63 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.78 (d, 1H, アリール), 6.83 (d, 4H, DMT アリール), 7.2→7.8 (m, 2OH, アリール), 8.05 (d, 2H, アリール)。

実施例13

Nー[アセトキシー2ーオキシエチル]ーNー[Oー(3(Oー(4,4'ージメトキシトリチル)ー1ーオキシメチル)ー4ーニトロフェニル)ー3ーオキシプロピル]ーNー[Oー(t ertーブチルジフェニルシリル)ー3ーオキシゾー6ーオキシヘキシル]アミン(化合物16、スキーム4)の合成

無水アセトニトリル(5 ml)に溶解した化合物12(66 mg, 0.10 mmol)に、炭酸カリウム(55 mg, 0.4 mmol)および化合物13a(

反応混合物 1 ml, 約 0.30 mmol) を加え、次にフラスコに塩化カルシウム乾燥チューブで栓をした。次に、反応混合物を室温で合計 22 時間攪拌し、その後、炭酸カリウムを汙別し、回転蒸発により溶媒を除去した。次に、得られた油状物をシリカゲルカラム (14 cm × 1 cm) にかけて、生成物をエーテル/石油エーテル 40-60℃, 75%/25% 混合物で溶出した。純粋生成物分画を合わせ、蒸発させて透明ガムを得た。6 mg, 6%, $R_F = 0.47$ エーテル/石油エーテル 40-60℃, 80%/20%。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 1.05 (s, 9H, ^tBu), 1.8 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OSi}$), 1.9 (m, 5H, $\text{O}_2\text{CCH}_3 + \text{ArOCH}_2-$), 2.76-2.92 (m, 6H, CH_2N), 3.51 (t, 2H, $J = 6.6 \text{ Hz}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSi}$), 3.79 (s, 6H, DMT-OCCH_3), 3.85 (m, 2H, CH_2OSi), 4.12 → 4.23 (m, 4H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2 + \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4.64 (s, 2H, ArCH_2ODMT), 6.83 (m, 5H, 1 アリール + DMT-アリール), 7.23 → 7.50 (m, 16H, アリール), 7.68 (m, 4H, アリール), 8.10 (d, 1H, $J = 9.06 \text{ Hz}$, アリール)。

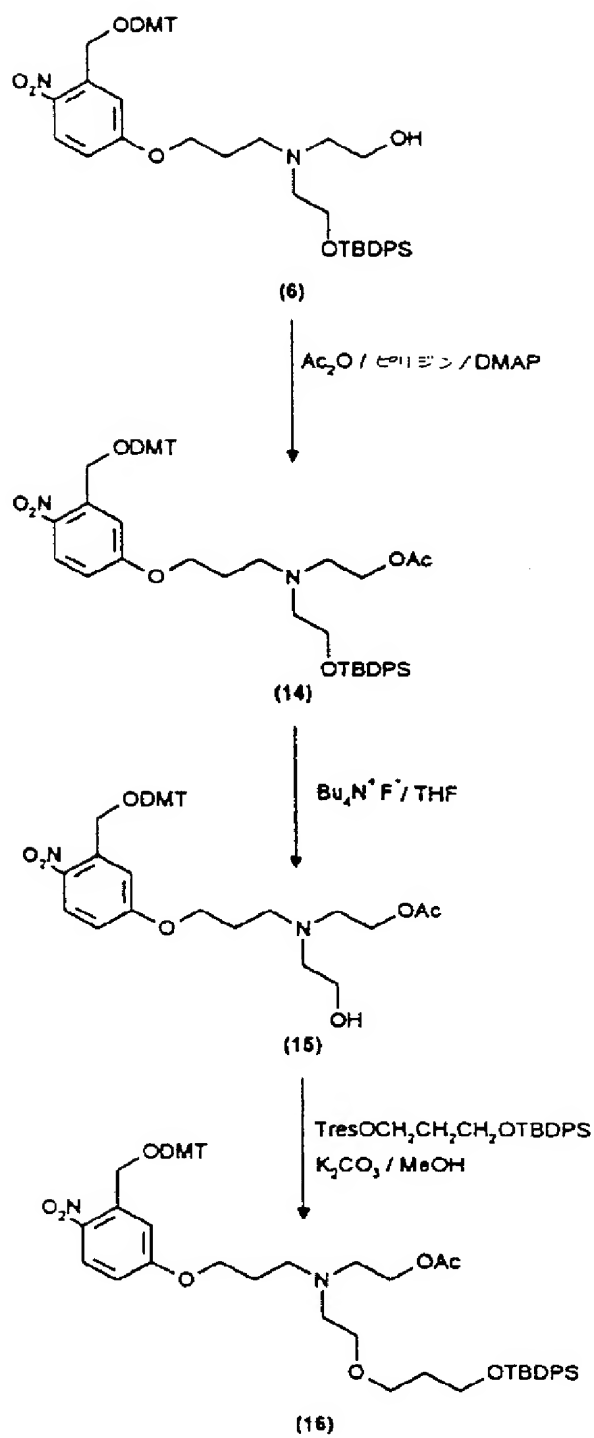
上述と類似の反応条件により、トレスレート 13b を用いて以下の化合物も合成した。

N-[アセトキシ-2-オキシエチル]-N-[O-(3(O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-1-オキシメチル)-4-ニトロフェニル)-3-オキシプロピル]-N-[O-(tert-ブチルジフェニルシリル)-5-メチル-3-オキソ-6-オキシヘキシル]アミン。この化合物は、透明ガムである。 $R_F = 0.53$ エーテル/石油エーテル 40-60℃, 80%/20%。

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3 , δ): 0.88 (d, 3H, CH-CH_3), 1.00 (s, 9H, ^tBu), 1.9 → 2.1 (m, 6H, $\text{O}_2\text{CCH}_3 + \text{CH-CH}_3 + \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.7 → 3.0 (m, 6H, CH_2N), 3.4 → 3.7 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{O-}$), 3.79 (s, 6H, DMT-OCCH_3), 4.0 → 4.4 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{O-}$), 4.64 (s, 2H, ArC

$\underline{\text{H}}_2\text{ODMT}$), 6.83 (m, 5H, アリール), 7.2→7.7 (m, 20H, アリール), 8.01 (d, 1H, アリール)。

スキーム 4



実施例 14

固体支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成

連結基 9 および 10 (スキーム 2 の化合物 9 および 10) を有する制御孔ガラスを自動オリゴヌクレオチド合成器 (A B I 3 8 1 A) において用いられるカラム中に装填した。用いた量は 0.2 または 1 μ m o l スケールの合成用の量である。カラムを自動合成器中に挿入し、次にこれを適当なサイクル用にプログラムした。2つの異なるタイプのヌクレオチド前駆体を用いた: 5' ヒドロキシル上にジメトキシトリチル保護基を有する通常のホスホルアミダイト; 5' ホスホルアミダイトおよび 3' ヒドロキシル上にジメトキシトリチル保護基を有する「逆シントン」。これらの支持体上で合成したオリゴヌクレオチドの一覧は表 4 に示される。ここで R 9 および R 10 はそれぞれ化合物 9 および 10 に由来するものである。収量は、それぞれのカップリングにおいて放出されたジメトキシトリチル基の量から監視した。これらの収量は、通常のオリゴヌクレオチド合成について用いられる C P G 支持体上で得られるものに対応した。

表 4

末端基	配列	通常方向	逆方向
R 9	T ₅		√
R 10	T ₅		√
R 10, DMT	T ₅		√
R 9, DMT	T ₅	√	
R 10, DMT	T ₅	√	
R 10	A ₁₀	√	

実施例 15

被検体を無傷のまま残す条件下におけるタグの合成

支持体 9 上で 5' R 9 T₅ を合成した後、固体支持体を分割し、一部を T H F 中の 5 m M フッ化テトラブチルアンモニウムで室温で 10 分間処理して、t-ブチルジフェニルシリル保護基を除去した。両方の試料を 29% アンモニアで室温で一晩処理して、固体支持体から生成物を除去した。真空下にアンモニアを除去し、固体残渣を水に溶解した。H P L C は、上首尾にシリル保護基が除去され D M T 基が残っていたことを示した。この実施例は、他方をその場に残す条件下で

2つの保護基を除去しうることを示し、さらに、保護基の除去によりオリゴヌクレオチド鎖が無傷で残ることを示す。

実施例 16

タグを付けた被検体の生化学反応

16 a. タグを付けたオリゴヌクレオチドの酵素的リン酸化

5'末端にホスフェート基を有するオリゴヌクレオチドを得ることは、多くの目的のために有用であろう。そのような基は、ライゲーション反応においてオリゴヌクレオチドを供与体として用いようとする場合に必要であり、生化学的特性を試験するために放射性基を導入する有用な方法である。

3'末端に結合したタグR9およびR10を有するオリゴヌクレオチドA₅、A₁₀およびT₅を、シリル保護基を除去するかまたは除去せずに製造した（これは、まだ固体支持体上にあるオリゴヌクレオチドを、アセトニトリル中の5 mM フッ化テトラブチルアンモニウム溶液で、室温で15分間処理することにより実施した）。これらのオリゴヌクレオチドを、供給元により推奨される標準的なプロトコールにしたがって、T4ポリヌクレオチドキナーゼおよびガンマ-³³P-ATPを用いてリン酸化した。0.5 M炭酸水素アンモニウムで発色させたポリエチレンイミン（PEI）充填セルロース上の生成物の薄層クロマトグラフィーは、それぞれの場合において、標識されたリンがほぼ完全にオリゴヌクレオチドに移動したことを示した。

16 b. タグを付けたオリゴヌクレオチドの酵素的ライゲーション

タグを付けたオリゴヌクレオチドのいくつかの応用のためには、これらをレセプターにライゲーションすることが有用であろう。我々は、以下の試験により、タグを付けたオリゴヌクレオチドが酵素的ライゲーションを行い得ることを示した。

(1) 5'-末端にタグを付けたオリゴヌクレオチド

この試験においては、鋳型は

5'-ATCAAGTCAGAAAAATATATA（配列番号1）

であった。これを、放射性リンを用いて5'-末端でリン酸化した供与体

3'-TAGTTCAAGTC (配列番号2)

にハイブリダイズさせた。それぞれ、鋳型中の5つのAの並びにハイブリダイズさせた後に供与体の5'リン酸化末端にライゲーションしうる配列T₅の修飾を用いて、4つのライゲーション反応を実施した。反応において用いられた4つのオリゴTは、その5'-末端の性質において異なっていた。1つはヒドロキシルを介して結合したジメトキシトリチル基を有していた。第2および第3のものは、ホスホジエステル結合を介して5'-末端に結合したタグR9およびR10を有していた。第4のものは、正常な5'-OHを有する正の対照であった。負の対照は、オリゴTを欠失したものであった。ライゲーション反応は、T4リガーゼを用いて、供給元の指示にしたがって実施した。反応は、0.75M炭酸水素アンモニウム溶液で発色させたPEI-セルロース上のTLCにより分析した。4つのすべての反応は、クロマトグラム上に、供与体より移動度の低い追加のスポットを示した。予期されたように、負の対照は追加のスポットを示さなかった。このことは、異なるタグを有するオリゴヌクレオチドがいかに配列特異的ライゲーション反応に関与しうるかを示す。

Cozzarelliら(1967)は、相補的鋳型の存在下において、固体支持体に結合したポリヌクレオチドを受容体にライゲーションしうることを示した。

実施例17

タグを付けたオリゴヌクレオチドの、固体支持体に繋げられたオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーション

実施例16bは、タグを付けたオリゴヌクレオチドがライゲーション反応に関与しうることを示す。ライゲーションはデュープレックス形成工程に依存するため、このことは、これらのオリゴヌクレオチドが溶液中におけるデュープレックス形成にも関与しうることを意味する。以下の実験は、これらが固体支持体に繋

げられたオリゴヌクレオチドともデュープレックスを形成しうることを示す。製造元の指示にしたがって、アミン化されたポリプロピレンのシートの表面上でT₁₀を合成した。このプロセスは1mm²あたり約10pmolのオリゴヌクレオ

チドを生成することが知られている。3.5 M塩化テトラメチルアンモニウム中の、5'末端において ^{33}P で標識され、かつ3'においてR10でタグを付けたA₁₀の溶液(1 μl あたり65 p m o l)を誘導化ポリプロピレンの表面上に置き、4℃で一夜放置した。ハイブリダイゼーション溶媒中で洗浄した後、約1/3のプローブが繋がれたオリゴdTにハイブリダイズしたことが観察された。これは、ハイブリダイゼーションの理論的限界に近く、タグを付けたオリゴヌクレオチドが高い効率でハイブリダイゼーション反応に関与しうることが示された。

実施例 18

タグの光分解

光分解によりタグを除去する可能性は、これらの有用性を非常に増強する。これは、質量分析器においてレーザー脱離による直接分析を可能にする。これは、タグの簡単な除去方法を提供し、他の生化学的または化学的プロセスを可能とするであろう。

18a. バルク光分解

ニトロベンジル基は、305 nmの照射に対して反応活性であることが知られている。R10A₁₀およびR10T₅の水溶液を、核酸に検出可能な損傷を与えないことが知られている条件下で、トランスイルミネータから2 cmの距離で20分間照射した。HPLCによる分析は、予期された光分解生成物を示し、元の化合物の残渣は検出できなかった。

18b. 質量分析器におけるレーザー誘導光分解

R10T₅およびT₅R10の試料を、追加のマトリックスを有しない飛行時間質量分析器(Finnigan Laser mat)の金属標的の上に置いた。スペクトルは、ポジティブモードで他の試料中には存在しない質量約243の単一の飽和ピークを示した。

実施例 19

異なる被検体に結合した異なるタグの質量分析法による同定

3'末端へのタグとして結合したジメトキシトリチル基を有する一連の5つの

チミジン残基を、慣用的な固相法により、但し「逆シントン」を用いて合成した。質量分析器において、この化合物は、ポジティブイオンモードで質量304に大きな区別しうるピークを与えた。これに対し、上記にR10と称されるタグを有する一連の10個のアデノシン残基は、ポジティブイオンモードで質量243に大きな区別しうるピークを与えた。いずれの場合においても、レーザー脱離は、マトリックスの不在下において実施した。いずれの場合においても、タグを有しないオリゴヌクレオチドのピークは存在しなかった。これらの実施例は、質量分析のトレース中の、被検体の合成の間に取り込まれたタグに由来するピークの存在から被検体配列を同定することは容易に可能であること、および特有のタグはこれらの異なる質量により容易に同定しうることを示す。

図面の説明

図1. 特定のタグを有する分子の合成の一般的スキーム

合成は、被検体合成用の基を付加するための少なくとも1つの部位およびタグの合成用の部位を有する連結基(L)から開始する。(連結基はまた、合成の間、固体支持体に可逆的に結合させることもでき、また、分析において補助となる荷電基等の基を生成するための部位を有していてもよい)。PaおよびPrはそれぞれ、被検体前駆体およびレポーターの一時的保護基である。これらは、異なる処理により除去することができる。例えば、Paは酸または塩基に対して反応活性な基、例えばトリチル、F-MOCまたはt-BOCであり、Prはフッ化物で処理することにより除去可能な基、例えばシリル残基である。基U-Zは保護基を有していてもよいが、これらはPaおよびPrを除去するために用いられる試薬に対して安定でなければならない。カップリング化学は、異なるタイプの被検体について異なるであろう。オリゴヌクレオチドおよびペプチド合成については標準的方法を用いることができる。

図2には3つの異なるタイプのタグが示されている。第1のスキームについては、タグのそれぞれの伸長は、被検体に加えられる残基の位置およびタイプの両方に特異的なレポーターを用いて実施する。このスキームではカップリングは重要ではない。

第2および第3のスキームにおいては、位置は、残基を被検体に加えるときの合成の段階で達成されるレポーターの総質量により規定される。この場合、分子の部分をキャップすることによりタグの伸長の一部を終結させることが重要である。第2および第3のスキームは、レポーターを加える方法において互いに異なる。第2のスキームにおいては、レポーターは伸長剤の中にあり、第3のスキームにおいてはレポーターはキャップ中にある。

図2. 3つのタイプの分子特異的タグ

Aは、被検体(U-Z)中の基の位置(下つき)および同一性(上つき)の両方を特定するレポーター(E)から作成されたタグを示す。このような組は、位置を特定するために、増加する式量の一連の脂肪鎖を含み得る。例えば、1位にメチレン、2位にエチレン、3位にプロピレン等。これらは、炭素および水素の異なる同位体組成により基特異的タイプに区別を生じさせることができる。例えば、上述の表1に示されるように、 CH_2 には6個の異なる同位体組成がある。これらのうち4個は1質量単位ずつ異なり、質量分析法によって容易に区別することができる。差異標識の別の方法を考察することもできる。例えば、位置または基を異なる電荷を有するレポーター基で印づけすることができる。このような基は、質量分析法を含む多くの方法により分離し認識することができる。

Bは、例えば被検体の任意の構造を一連のタグに結合させるような部分合成により作成されたタグを示す。このシリーズの第1のものは、被検体の第1の基に特異的なレポーター基を有し、第2のものは、第1のレポーター基および、被検体の第2の基に特異的なレポーター基を有し、そしてその他も同様である。このようなシリーズは、タグを伸長するために2種類の前駆体を用いることにより容易に作成することができる。1つは、可逆的保護基により保護されたものであり、1つはそれ以上の伸長を回避するものである。例えば、 RX と $\text{P}-(\text{CH}_2)_n\text{X}$

(ここでRは、メチルまたはエチル等の非反応性脂肪族基であり、Pは可逆性保護基であり、XはPにより保護された基と反応しうる活性化残基である)との混合物である。非反応性脂肪族基により「キャップ」された分子は、次回の脱保護

および伸長には関与しないであろう。

Bにおいては、基特異的情報は、合成を伸長させるために用いられる残基に含まれる。Aと同様に、情報は質量同位体を用いて与えられることができる。例えば、CおよびHの同位体で標識した CH_2 残基を $\text{P}-(\text{CH}_2)_n\text{X}$ に付加するたびに、レポーターに異なる質量を与え得る追加の部位が付加される。 $(\text{CH}_2)_n$ の質量は $14n$ から $17n$ の範囲にわたり、この範囲には $4+3(n-1)$ 個の異なる質量がある。したがって、エチレン基については、28から34の範囲に7個の区別しうる質量があり、プロピレン基については、42から51の範囲に10個の区別しうる質量がある。

Cは、いかにして基特異的情報を異なる方法で付加しうるかを示す。この場合、これは鎖停止剤、すなわち例Bにおける「キャップ」中に含まれている。ここでもまた、脂肪族残基を標識することにより異なる質量を与えることができる。位置情報は、停止剤が付加された伸長の長さにより与えられる。例えば、Eが $(\text{CH}_2)_2-\text{O}$ の場合、鎖停止剤は同位体により標識された式量15から19のメチル基である。それぞれの伸長は、レポーターに44質量単位を付加するであろう。最も短いレポーターの質量範囲は、 $44+15=59$ から $44+19=63$ の範囲である。第2の位置の範囲は、 $88+15=103$ から $88+19=107$ の範囲である。他のものも同様であり、第6の位置の範囲は、 $284+15=299$ から $284+19=303$ である。この範囲には重複はなく、停止剤および追加の原子による伸長を用いることにより、レポーターの数および範囲を拡張しうることがわかる。

参考文献：

1. Brenner, S. and Lerner, R.A. (1992). Encoded combinatorial chemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5381--5383
2. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., and Crkvenjakov, R. (1989). Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: Theory of the method. Genomics 4: 114--128.
3. Pillai, V. N. R. (1980). Photoremovable protecting groups in organic chemistry. Synthesis 39: 1-26
4. Hoheisel, J.D., Maier, E., Mott, R., McCarthy, L., Grigoriev, A.V., Schalkwyk, L.C., Nitzetic, D., Francis, F. and Lehrach, H. (1993) High resolution cosmid and P1 maps spanning the 14 Mbp genome of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Cell 73: 109-120.
5. Khrapko, K. R., Lysov, Yu. P., Khorlyn, A. A., Shick, V. V., Florentiev, V. L., and Mirzabekov. (1989). An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. FEBS Lett. 256: 118-122.
6. Patchornik, A., Amit, B. and Woodward, R. B. (1970). Photosensitive protecting groups. J. AMER. Chem. Soc. 92:21: 6333-6335.
7. Ross, M.T., Hoheisel, J.D., Monaco, A.P., Larin, Z., Zehetner, G., and Lehrach, H. (1992) High density gridded Yac filters; their potential as genome mapping tools. In "Techniques for the analysis of complex genomes." Anand, R. ed. (Academic Press) 137-154.
8. Southern, E. M. (1988). Analyzing Polynucleotide Sequences. International Patent Application PCT GB 89/00460.

9. Southern, E.M., Maskos, U. and Elder, J.K. (1992). Analysis of Nucleic Acid Sequences by Hybridization to Arrays of Oligonucleotides: Evaluation using Experimental Models. *Genomics* 12: 1008-1017.
10. de Vries, M.S., Elloway, D.J., Wendl, R.H., and Hunziker, H.E. (1992). Photoionisation mass spectrometer with a microscope laser desorption source, *Rev. Sci. Instrum.* 63(6): 3321-3325.
11. Zubkov, A. M., and Mikhailov, V. G. (1979). Repetitions of s-tuples in a sequence of independent trials. *Theory Prob. Appl.* 24, 269-282.
12. Cozzarelli, N.R., Melechen, N.E., Jovin, T.M. and Kornberg, A. (1967). *BBRC*, 28, 578-586.

【配列表】

配列番号：1

(i) 配列の特性：

- (A) 配列の長さ： 21
- (B) 型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直線状

(iii) 配列：

ATCAAGTCAG AAAAATATAT A

21

配列番号：2

(i) 配列の特性：

- (A) 配列の長さ： 10
- (B) 型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直線状

(iii) 配列：

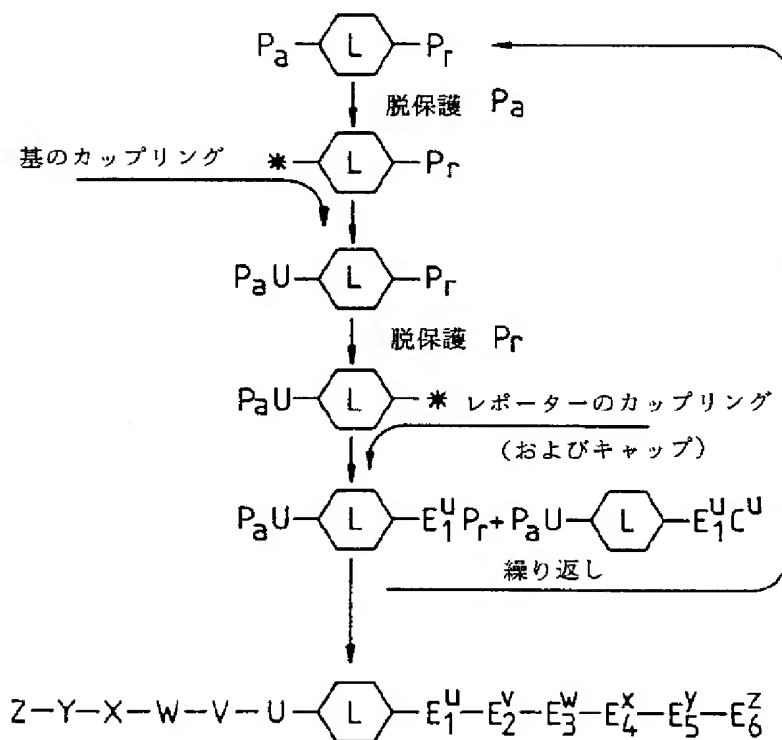
CTGACTTGAT

10

【図1】

Fig.1.

特定のタグを有する分子の合成の一般的スキーム



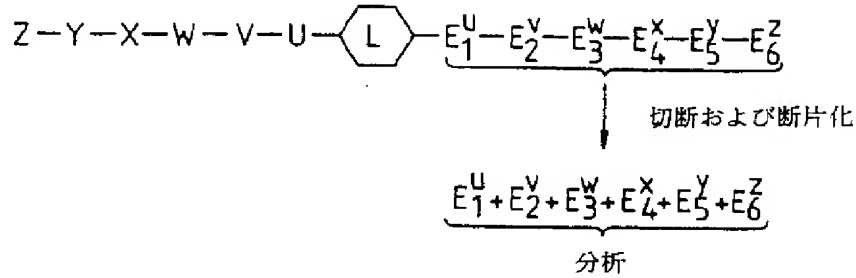
【図2】

Fig.2.

3つのタイプの分子特異的タグ

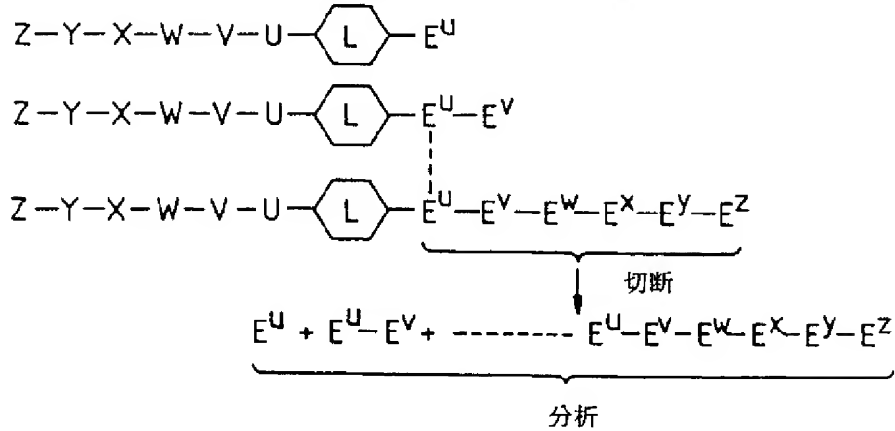
A.

位置および基特異的レポーター



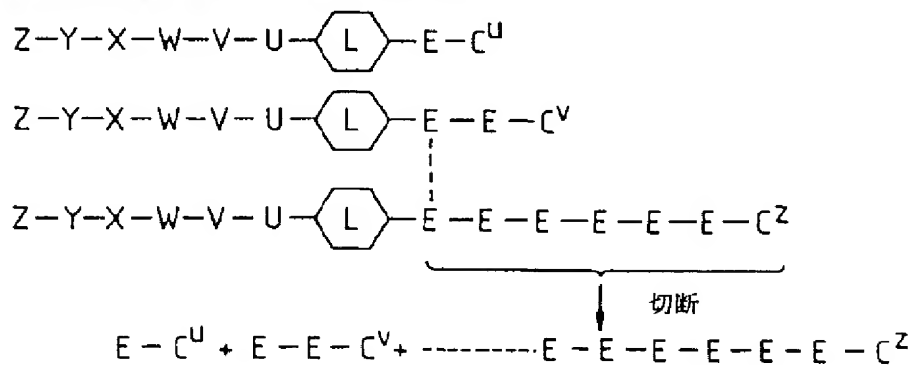
B.

基特異的レポーター - 位置は部分生成物により特定される



C.

基特異的末端標識 - 位置は分析生成物により特定される



【図3】

Fig.3a.

コードされたオリゴヌクレオチドの合成

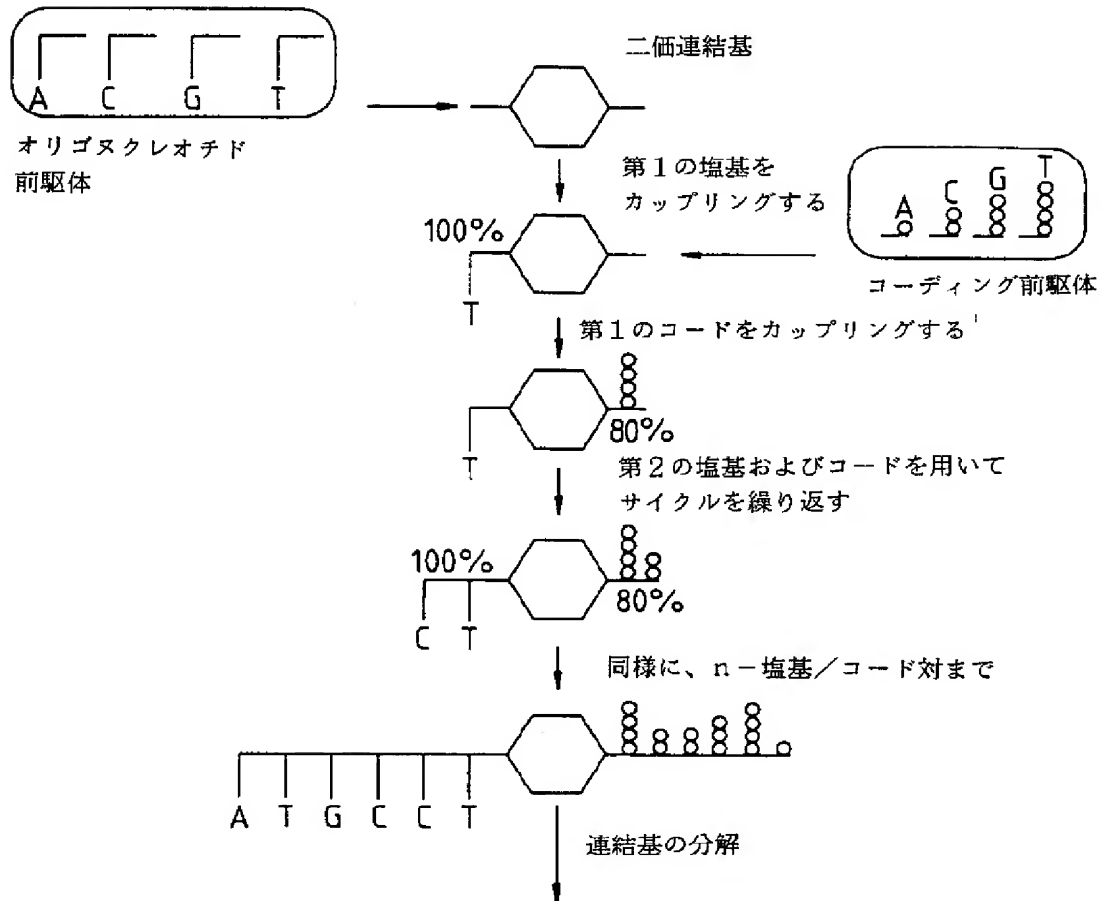
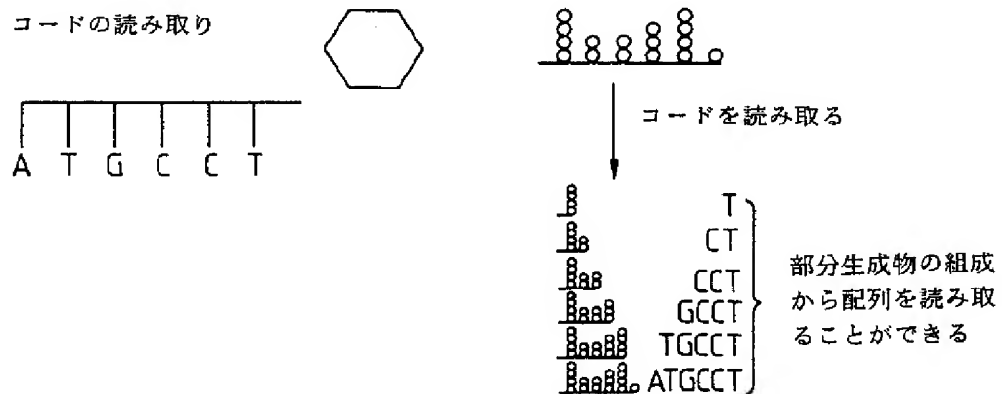


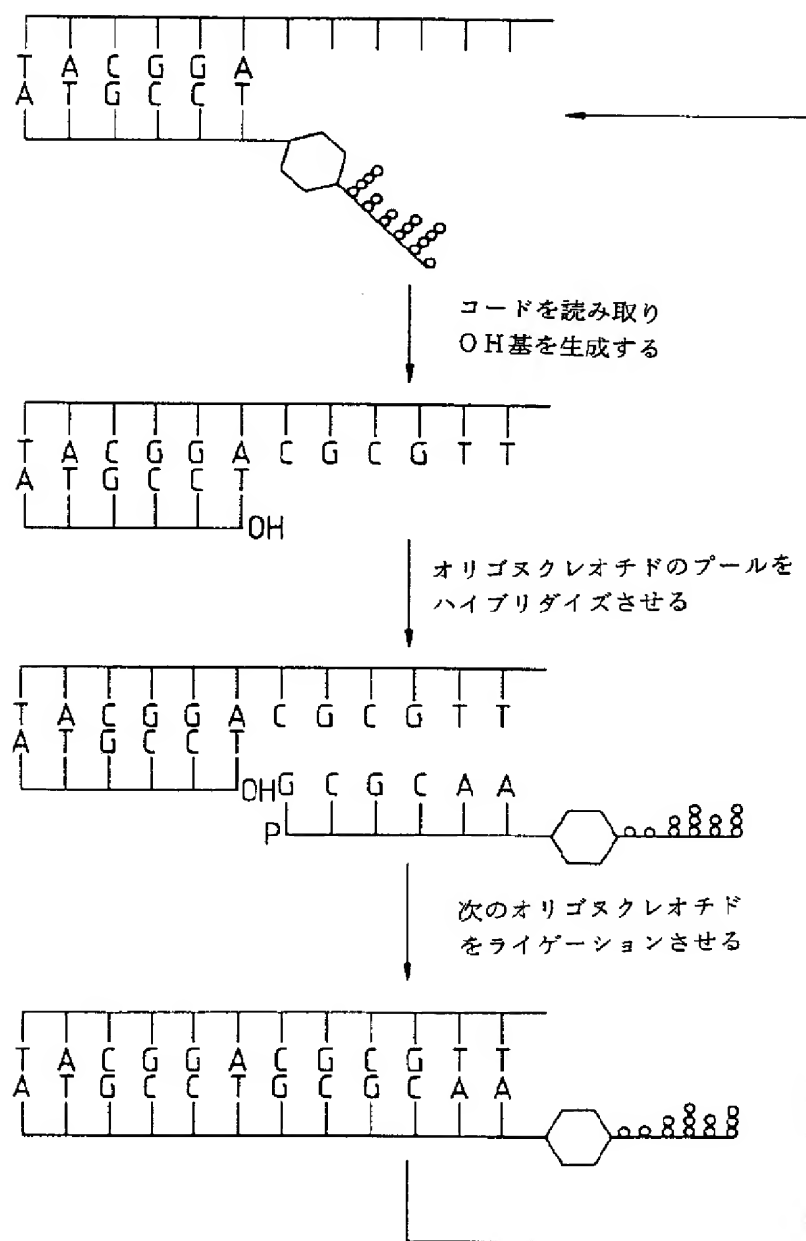
Fig.3b.

コードの読み取り



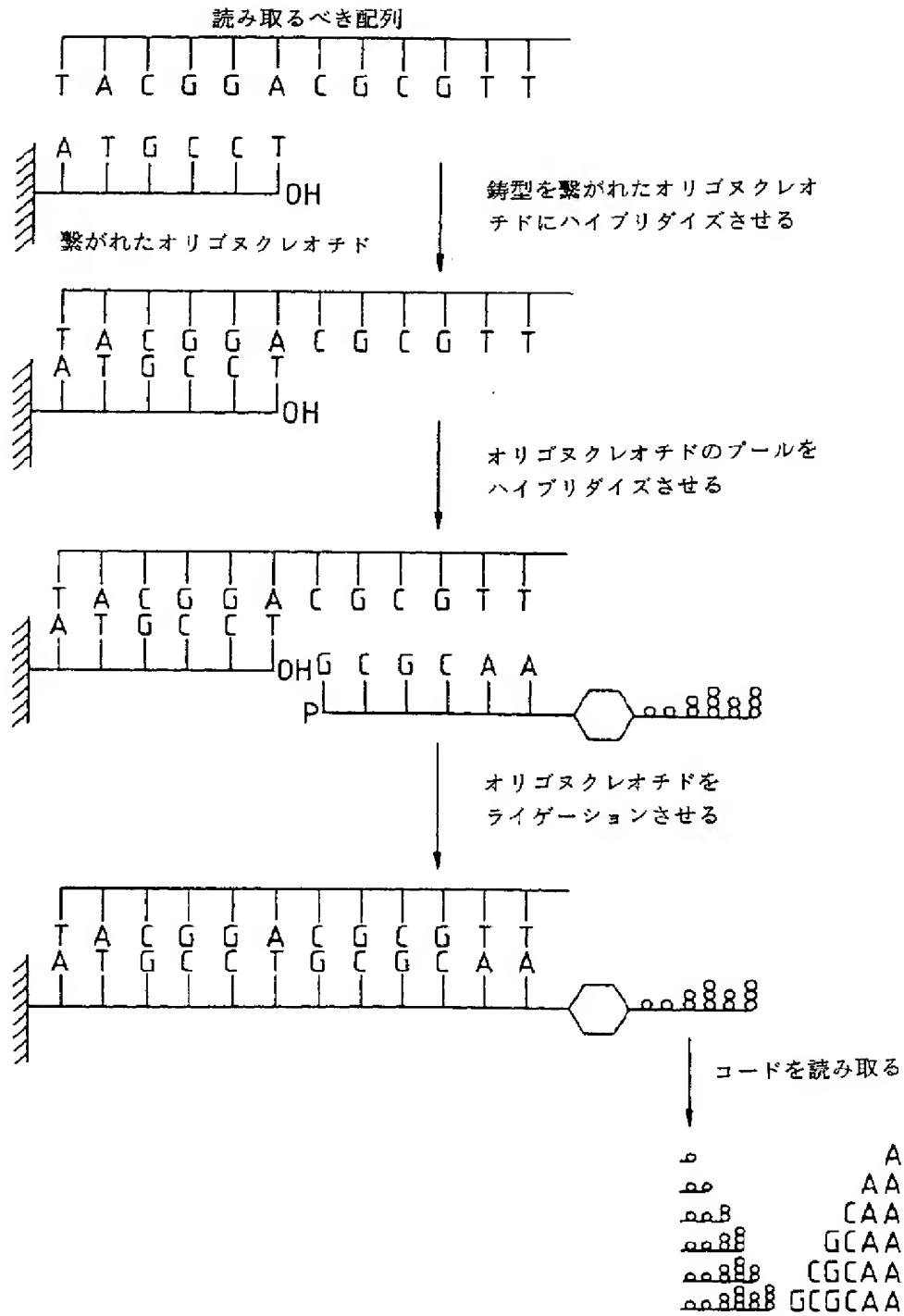
【図4】

Fig.4.



【図5】

Fig.5.



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/GB 94/01675
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68 C07H21/04 C07K2/00 C12P19/34 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q C07H C07K C12P G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL. ACAD SCI., vol.89, no.12, 15 June 1992, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 5381 - 5383 S. BRENNER AND R.A. LERNER 'Encoded recombinatorial chemistry' see page 5381, left column, line 1 - page 5383, right column, line 33 ---	1,4,9-15
Y	WO,A,93 06121 (AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.) 1 April 1993 cited in the application the whole document ---	1,4,9-15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 October 1994		Date of mailing of the international search report 28. 10. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2240 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 94/01675

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NUCL. ACIDS RES., vol.21, no.15, 25 July 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 3347 - 3357 E. NORDHOFF ET AL. 'Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry' see page 3349, right column, line 5 - page 3357, left column, line 12 ---</p>	1,4,9-15
Y	<p>RAPID COMMUNICATION IN MASS SPECTROMETRY, vol.6, no.6, June 1992, JOHN WILEY & SONS, LTD., NEW YORK US; pages 369 - 372 G.R. PARR ET AL. 'Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of synthetic oligonucleotides' see page 369, left column, line 1 - right column, line 9 see page 371, right column, line 8 - page 372, left column, line 11 ---</p>	1,4,9-15
A	<p>WO,A,93 05183 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 18 March 1993 the whole document -----</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 94/01675

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9306121	01-04-93	AU-A- 2661992	27-04-93
		CA-A- 2118806	01-04-93
		EP-A- 0604552	06-07-94
WO-A-9305183	18-03-93	AU-A- 2674092	05-04-93

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN